



VIP projekt



Poboljšanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske zdravstvenom selekcijom i genetičkom evaluacijom

**Darko Vončina, Silvio Šimon, Zdravka Sever, Joško Kaliterna,
Tihomir Miličević, Aleš Vokurka, Ivan Pejić**

Priručnik s rezultatima projekta

Poboljšanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske zdravstvenom selekcijom i genetičkom evaluacijom

Darko Vončina, Silvio Šimon, Zdravka Sever, Joško Kaliterna,
Tihomir Miličević, Aleš Vokurka, Ivan Pejić

Priručnik je rezultat provedenog VIP projekta naziva „*Poboljšanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske zdravstvenom selekcijom i genetičkom evaluacijom*“ financiranog u okviru prioritetnog područja unaprjeđenje tehnologije u održivim sustavima poljoprivredne proizvodnje.

Poboljšanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske zdravstvenom selekcijom i genetičkom evaluacijom

Voditelj projekta:

doc. dr. sc. Darko Vončina

Suradnici:

prof. dr. sc. Ivan Pejić

izv. prof. dr. sc. Tihomir Miličević

dr. sc. Silvio Šimon

dr. sc. Zdravka Sever

dr. sc. Joško Kaliterna

dr. sc. Aleš Vokurka

Mladen Poletti Kopešić, tehničar

Sufinanciranje projekta:

Vijeće za istraživanja u poljoprivredi (VIP)

Maraska d.d.

Rasadnik Prud d.o.o.

Nakladnik: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

Tisak: Luka 24 j.d.o.o.

Naklada: 200 primjeraka

ISBN: 978-953-7878-37-5

VIP projekt
Republika Hrvatska
Ministarstvo poljoprivrede

**Poboljšanje kvalitete sadnog materijala višnje
Maraske zdravstvenom selekcijom i genetičkom
evaluacijom**

Trajanje projekta:
srpanj 2014 – srpanj 2015

Priručnik s rezultatima projekta

Zagreb, kolovoz 2015.

Sadržaj

Predgovor.....	5
1. Povijest uzgoja višnje Maraske u Hrvatskoj.....	6
2. Opis višnje Maraske.....	7
3. Dosadašnje spoznaje iz područja istraživanja projekta.....	8
4. Skraćeni prikaz projekta.....	8
5. Ciljevi projekta.....	10
6. Aktivnosti po fazama istraživanja.....	11
7. Materijali i metode istraživanja.....	12
7.1. Istraživanje zdravstvenog stanja.....	12
7.2. Genetičke i pomološke analize.....	16
8. Rezultati.....	19
8.1. Rezultati istraživanja zdravstvenog stanja.....	19
8.2. Rezultati genetičkih i pomoloških analiza.....	24
8.3. Rezultati po fazama istraživanja.....	25
9. Ekonomska korist od realizacije projekta.....	26
10. Društvena korist od realizacije projekta.....	27
11. Smjernice za podizanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske.....	27
12. Objavljeni radovi na osnovu provedenog istraživanja.....	29
13. Održana predavanja i prikazi rezultata istraživanja.....	29
14. Literatura.....	30

Predgovor

Voćarska proizvodnja zauzima značajno mjesto u poljoprivrednoj proizvodnji Republike Hrvatske. Među zastupljenim voćnim vrstama svojim svojstvima ističe se višnja Maraska (*Prunus cerasus* var. *marasca*). Uzgoj višnje Maraske najviše se raširio u Ravnim kotarima gdje se ona danas smatra autohtonom vrstom. Areal njezinog uzgoja u kojem postiže optimalna svojstva ploda je od Zadra do Makarske. Trenutno je na području Zadarske, Šibensko-kninske i Splitsko-dalmatinske županije zasađeno između 500 i 600 ha višnje Maraske, odnosno između 250.000 i 300.000 stabala od čega najviše otpada na Zadarsku županiju - oko 450 ha odnosno oko 230.000 stabala. Ukupna proizvodnja u Republici Hrvatskoj je trenutno oko 1.500 tona, od čega najveći dio otpada na Zadarsku županiju. Tehnologija uzgoja je zastarjela, a razina znanja manjih privatnih proizvođača je u nekim sferama agrotehnike i pomotehnike vrlo niska. Prevladava klasičan tip uzgoja sa razmacima sadnje 6 x 6 m (277 stabala/ha), 6 x 5 m (333 stabala/ha) i 5 x 4 m (500 stabala/ha). Uobičajeni uzgojni oblik je vaza sa tri skeletne grane. Ovakva tehnologija uzgoja odgovarala je za nekadašnje proizvodne uvjete kada se koristila široka mehanizacija i ručna berba. Uvođenjem moderne mehanizacije u intenzivne nasade, koja između ostalog uključuje i strojnu rezidbu i strojnu berbu tresačima ili kombajnima, javlja se potreba za promjenom tehnologije. Neophodno je modernizirati uzgoj što se osobito odnosi na berbu na koju otpada velik dio troškova uzgoja. U pogledu zdravstvenog stanja sadnog materijala i selekcije potrebno je intenzivirati znanstveno istraživački rad i istražiti nove klonove vrijednih svojstava te unaprijediti rasadničarsku proizvodnju formiranjem matičnog nasada sa sadnim materijalom testiranim na najvažnije virusne i bakterijske bolesti. Procjena je da prehrambena industrija u ovom trenutku zajedno sa izvozom i trgovinom na malo može podnijeti između 6.000 i 10.000 t ploda za što bi trebalo podići oko 200 ha novih nasada.

1. Povijest uzgoja višnje Maraske u Hrvatskoj

Višnja Maraska (*Prunus cerasus* var. *marasca*) se prvi put kao pisani trag spominje u Zadru 1399. godine kada je u bilježničkim spisima zabilježeno "*jedno veliko stablo maraske*" u neposrednoj blizini samoga grada Zadra. Radilo se o podjeli jednog vinograda pri čemu međa započinje od velikog stabla Maraske ("*ab arbore marascarum magna*"). S agronomskog aspekta zanimljivo je da se stablo Maraske spominje kao veliko dakle i staro, što navodi da je njezin uzgoj bio poznat i prije tog vremena. Daljnji zapisi datiraju iz 1447. godine kada se posredno spominje uzgoj višnje Maraske, jer odredbe donesene tada propisuju pristojbe koje seljaci moraju platiti prilikom donošenja plodova na Veliki trg u gradu Zadru. Zanimljivo je da se u tom dokumentu spominju plodovi trešnje (*ceresus*) i višnje Maraske (*marasca*) te da je plod Maraske imao veću vrijednost. Proizvodnja i uzgoj višnje Maraske se u srednjem vijeku intenzivira kada ljekarnik dominikanskog samostana na prijelazu iz 15. u 16. stoljeće od višnje Maraske priprema tipičan i aromatičan liker "*rozolj*". Kako je mletački senat poticao proizvodnju likera ona se brzo širi i zadarski liker postaje poznat, te se već javlja nekoliko proizvođača (Carceniga, Rota, Mola). Kako raste proizvodnja likera, raste i potreba za plodom i listom te se njezin uzgoj širi u Ravnim kotarima, ali i drugim dijelovima obale. Preokret nastaje 1759. godine kada proizvodnju likera započinje Francesco Drioli što je i početak industrijske proizvodnje likera u Zadru. Potkraj 18. stoljeća u gradu je već djelovalo desetak proizvođača sa oko 35 različitih likera od kojih je najznačajniji bio *Rosolio Maraskino*. Recepture su bile tajne i nisu se do današnjeg dana otkrivale. Pravi industrijski način proizvodnje nastaje na prijelazu iz 18. u 19. stoljeće te je do kraja 19. i početkom 20. stoljeća već bilo prisutno nekoliko industrijskih destilerija (Drioli, Luxardo, Sbalich, Pivac, Vlahov itd.). Uzgoj višnje Maraske raste, te se bilježi otkup ploda iz voćnjaka u Ravnim kotarima, Poljica i Šibenika, a kasnije se uzgoj širi na područje Makarske, osobito na otok Brač. Vrhunac proizvodnje višnja Maraska dostiže sedamdesetih godina prošlog stoljeća kada je, prema dostupnim podacima, broj stabala bio preko 1.000.000 te je zabilježena i rekordna proizvodnja od 12.150 tona. Šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog stoljeća u Ravnim kotarima se je i krčila

maslina a sadila višnja Maraska. Od tada broj stabala i količina ploda pada, a uzgoj se zadržao praktički samo na području Ravnih kotara gdje je danas relativno stabilan ponajviše zahvaljujući tvornici Maraska d.d. koja uz svoju plantažu "Vlačine" redovito i otkupljuje sve raspoložive količine ploda.

2. Opis višnje Maraske

Pradomovina višnje Maraske je prostor između Crnog mora i Kaspijskog jezera odakle je u prvoj epohi grčko-rimske civilizacije proširena diljem Europe pa tako i do naših krajeva. Uzgoj se zadržao i zaustavio baš na određenom dijelu Dalmatinske obale gdje plodovi višnje Maraske, vjerojatno zahvaljujući kombinaciji utjecaja klime i tla postižu izuzetna svojstva. Višnja Maraska spada u stablašice, red *Rosales*, porodica *Rosaceae*, rod *Prunus* (*Prunus cerasus* var. *marasca*). Deblo je ravno i tamnosmeđe boje. Krošnja je razvijena, okruglasta, srednje veličine s time da postoji i viseći ili pendula tip te uspravni ili *recta* tip krošnje. List je eliptičan do lancetast, tamno zelene boje, prema vrhu blago šiljast. Plod je sitan i vrlo aromatičan, sitniji nego kod višnje sa većim udjelom sjemenke (Slika 1.). Prosječna veličina ploda je 14 – 18 mm, težine 2,50 g sa udjelom šećera u prosjeku od 23 – 26 °Brix



Slika 1. Plodovi višnje Maraske pred berbu

3. Dosadašnje spoznaje iz područja istraživanja projekta

Kod višnje Maraske prva istraživanja vezana uz virusne bolesti radena su krajem sedamdesetih godina prošlog stoljeća (Šarić i Velagić, 1980) pri čemu je utvrđena prisutnost virusa nekrotične prstenaste pjegavosti (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRV), virusa kržljivosti šljive (*Prune dwarf virus*, PDV), virusa mozaika gušarke (*Arabis mosaic virus*, ArMV), latentnog virusa prstenaste pjegavosti jagode (*Strawberry latent ringspot virus*, SLRV), virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) i virusa mozaika soje (*Sowbane mosaic virus*, SMV). Od 1988. Zavod za zaštitu bilja (sada u sklopu Hrvatskog centra za poljoprivredu, hranu i selo) radi monitoring virusa šarke šljive u matičnjacima te je u više navrata utvrđena prisutnost navedenog virusa. Pisanih podataka o učestalosti pojave preostalih 15 virusa koji se navode u preporukama Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (*European and Mediterranean Plant Protection Organisation*, EPPO-a) nema. Prema iskustvima zemalja iz regije, prvenstveno Srbije (Mandić i sur., 2007), za očekivati je veću pojavnost viroza kod biljaka koje se trenutno koriste kao izvori pupova u proizvodnji sadnog materijala. Također, dosadašnja istraživanja utvrdila su veliku sličnost između sorti Maraska i Oblačinska, naročito pri korištenju SSR markera te je zbog toga moguća pogrešna identifikacija.

4. Skraćeni prikaz projekta

Jedan od osnovnih preduvjeta za održivu proizvodnju višnje Maraske je korištenje zdravog sadnog materijala visoke sortne čistoće. Višnja Maraska autohtona je sorta višnje Republike Hrvatske koja se zbog svog kemijskog sastava smatra najukusnijom višnjom na svijetu. Njezini najbolji uzgojni rezultati postižu se na području od Zadra do Makarske. Iako jako popularna i izvan Hrvatske (potrošnja u svježem stanju, kompoti, džemovi, marmelade, konditorska industrija, sokovi, likeri, itd.) kod ove sorte, i pored svih ranije spomenutih posebnosti, na tržištu ne postoji certificirani sadni materijal tj. materijal proizveden po standardima propisanim od strane Europske i mediteranske organizacije za zaštitu

bilja. Navedena organizacija standardom PM 4/29(1) odnosno certifikacijskom shemom za trešnju i višnju (Anonymous, 2000) propisuje da bi zdravstveno ispravan sadni materijal višnje trebao biti slobodan odnosno testiran na sljedećih 15 virusa: virus klorotične lisne pjegavosti jabuke (*Apple chlorotic leaf spot trichovirus*, ACLSV), virus mozaika jabuke (*Apple mosaic illarvirus*, ApMV), virus mozaika gušarke (*Arabis mosaic nepovirus*, ArMV), virus zvjezdastog mozaika petunije (*Petunia asteroid mosaic tombusvirus*, PAMV) te talijanski virus prstenaste pjegavosti karanfila (*Carnation Italian ringspot tombusvirus*, CIRV) – uzročnike virusnog raka trešnje, virus zelenog prstenastog šarenila trešnje (*Cherry green ring mottle foveavirus*, CGRMV), virus uvijenosti lista trešnje (*Cherry leaf roll nepovirus*, CLRV), male viruse trešnje 1 i 2 (*Little cherry closterovirus* 1 i 2, LChV-1 i LChV-2), virus šarenila lista trešnje (*Cherry mottle leaf trichovirus*, ChMLV) virus kržljivosti šljive (*Prune dwarf ilarvirus*, PDV), virus nekrotične prstenaste pjegavosti trešnje (*Prunus necrotic ringspot ilarvirus*, PNRSV), virus prstenaste pjegavosti maline (*Raspberry ringspot nepovirus*, RpRSV), latentni virus prstenaste pjegavosti jagode (*Strawberry latent ringspot nepovirus*, SLRSV), virus crnih prstenova rajčice (*Tomato black ring nepovirus*, TBRV). Također, prema navedenom standardu kandidati za predosnovni sadni materijal trebali bi biti slobodni i od slijedećih bakterija: *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* i *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

Osim navedenog problem je što mnoge autohtone sorte imaju više naziva (sinonima), a čest je slučaj da se jedinim imenom naziva više različitih genotipova (homonimi). Klasične metode identifikacije sorata zahtijevaju skupa višegodišnja mjerenja u posebno dizajniranim eksperimentalnim nasadima. Suvremene molekularno-genetičke metode omogućavaju brzu i pouzdanu identifikaciju sorte. Upotrebom mikrosatelitskih (SSR) markera moguće je utvrditi jedinstveni genetski profil višnje Maraske te osigurati sortnu čistoću matičnog nasada.

5. Ciljevi projekta

Cilj projekta bio je iz proizvodnih nasada u glavnom uzgojnom području višnje Maraske (Ravni kotari) odabrati oko 200 stabala od kojih su se neka u prijašnjim godinama pokazala kao stabla dobrih proizvodnih svojstava (količina i kvaliteta prinosa, otpornost na gljivične bolesti i štetnike). Na odabranim stablima provedeno je testiranje na prisutnost 15 ekonomski značajnih virusa propisanih po EPPO standardu PM 4/29(1), odnosno po certifikacijskoj shemi za trešnju i višnju. U svrhu provođenja testova prisutnost virusa u periodu mirovanja i tijekom vegetacije sa odabranih biljaka uzeti su prikladni uzorci (listovi, grančice). Testiranje je provedeno korištenjem različitih izvedbi enzimatsko-serološke metode ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) i molekularne metode lančane reakcije polimeraze nakon obrnutog prepisivanja (eng. *reverse transcription polymerase chain reaction*, kratica RT-PCR).

Kod biljaka slobodnih od svih testiranih virusa ili one sa najmanjim brojem virusa napravljen je njihov genetski profil primjenom mikrosatelitskih SSR markera kao potvrda da se radi o sorti Maraski. Neke od biljaka slobodne od svih navedenih virusa testirane su na prisutnost ekonomski značajnih bakterioza. U slučaju da se ne utvrdi niti jedna biljka slobodna od virusa one zaražene s najmanjim brojem virusa, a za koje se genetskim analizama potvrdi da pripadaju sorti Maraski, bit će predložene za postupak ozdravljenja.

6. Aktivnosti po fazama istraživanja

Planirano istraživanje podijeljeno je u 3 glavne faze pri čemu se detaljan opis planiranih radnji po pojedinim fazama nalazi u Tablici 1.

Tablica 1. Detaljan prikaz planiranih aktivnosti u projektu po različitim fazama istraživanja

I FAZA	Odabir i obilježavanje stabala višnje Maraske dobrih proizvodnih svojstava Uzimanje uzoraka lišća/grančica za laboratorijsko testiranje na prisutnost virusa
II FAZA	Laboratorijsko testiranje uzoraka na prisutnost virusa primjenom metode ELISA i molekularnom metodom RT-PCR Uzimanje uzoraka sa mogućih bezvirusnih biljaka za izradu genetskog profila upotrebom mikrosatelitskih (SSR) markera
III FAZA	Objedinjavanje rezultata laboratorijskih analiza (viroloških i genetičkih) Analize na prisutnost bakterija Davanje preporuke o pogodnosti pojedinih biljaka kao potencijalnih kandidata za predosnovni sadni materijal ili za postupak ozdravljenja Davanje smjernica za podizanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske

7. Materijali i metode istraživanja

7.1. Istraživanje zdravstvenog stanja

U najvećem nasadu višnje Maraske „Vlačine“ smještenom u Zemuniku Donjem (Slika 2.) u vlasništvu tvrtke Maraska d.d. postavili smo pokus provjere zdravstvenog stanja u pogledu zaraženosti virusima te genetičke evaluacije navedene sorte. Kako bi u nasadu od oko 190 hektara dobili što bolji uvid u zdravstveno stanje na različitim dijelovima nasada odabrano je i označeno 205 stabala (Slika 3.). Stabla su odabrana temeljem vizualnog uvida u količinu uroda, veličinu i obojenost plod, ocjenu zdravstvenog stanja te su svrstane u kategorije potencijalno boljih (elitnih), osrednjih i slabijih. Od navedenih 205 stabala 51 stablo je označeno kao elitno (potencijalne biljke za genetičke analize i matična stabla za proizvodnju bezvirusnog sadnog materijala), 103 kao osrednja (prosječna) stabla te 51 stablo kao slabije (kržljava, slabo bujna koja se djelomično ili potpuno suše). Ovakva zastupljenost stabala odabrana je sa ciljem dobivanja što objektivnijeg uvida u pojavnost virusa u cijelom nasadu što je bio prvi cilj predloženog projekta. Krajem

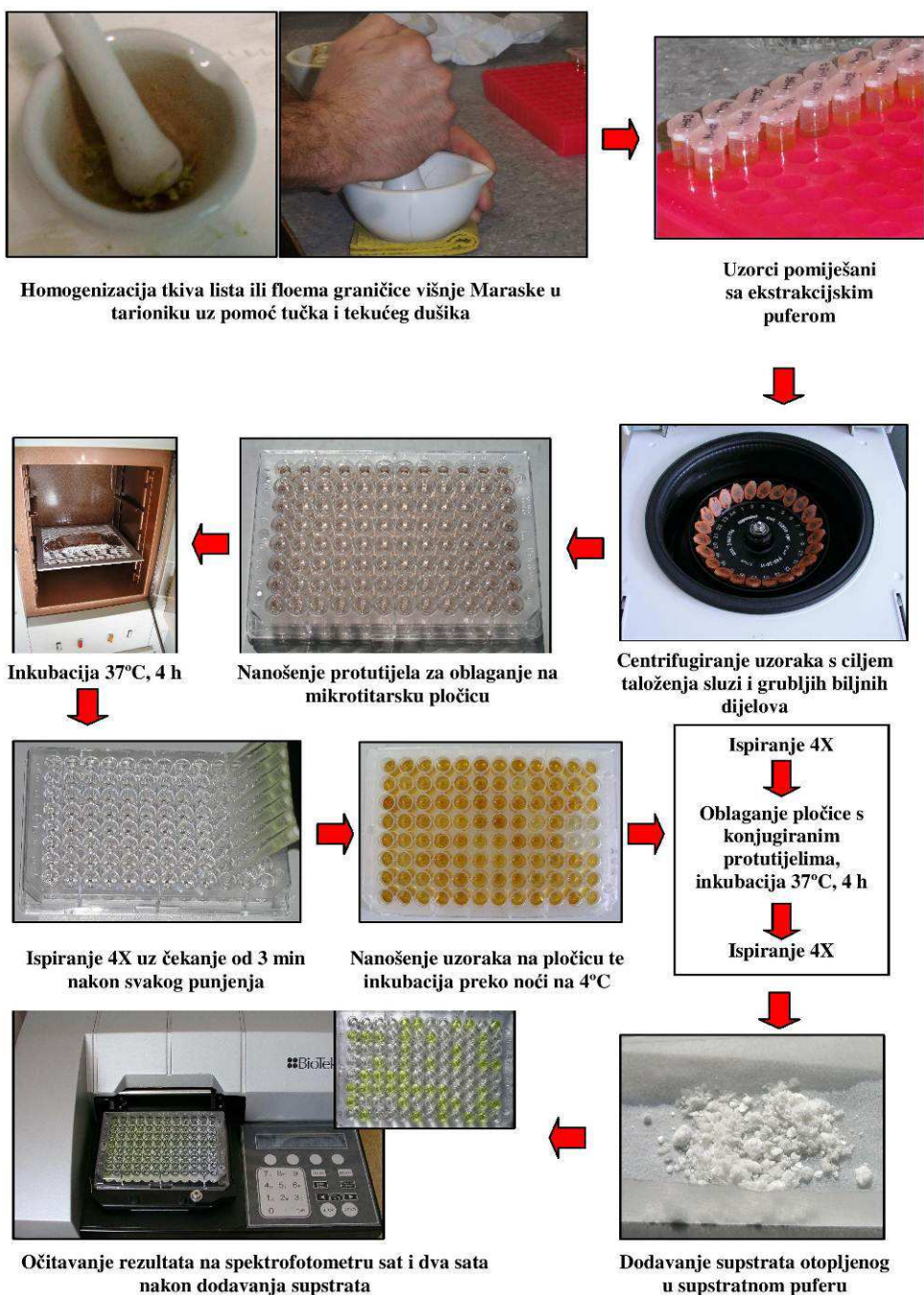


Slika 2. Plantaža višnje Maraske „Vlačine“ u kojem je provedeno istraživanje



Slika 3. Označavanje stabala uključenih u istraživanje

lipnja 2014., odnosno pred berbu, sa označenih stabala uzeti su uzorci listova sa četiri različite strane krošnje (zbog nejednoličnog rasporeda virusa) te su sva stabla testirana metodom ELISA na prisutnost 11 virusa: virus klorotične lisne pjegavosti jabuke (*Apple chlorotic leaf spot trichovirus*, ACLSV), virus mozaika jabuke (*Apple mosaic ilarvirus*, ApMV), virus mozaika gušarke (*Arabid mosaic nepovirus*, ArMV), virus zvjezdastog mozaika petunije (*Petunia asteroid mosaic tombusvirus*, PAMV), virus uvijenosti lista trešnje (*Cherry leaf roll nepovirus*, CLRV), virus kržljivosti šljive (*Prune dwarf ilarvirus*, PDV), virus nekrotične prstenaste pjegavosti trešnje (*Prunus necrotic ringspot ilarvirus*, PNRSV), virus prstenaste pjegavosti maline (*Raspberry ringspot nepovirus*, RpRSV), latentni virus prstenaste pjegavosti jagode (*Strawberry latent ringspot nepovirus*, SLRSV) te virus crnih prstenova rajčice (*Tomato black ring nepovirus*, TBRV). Budući da prema trenutno važećoj legislativi u Republici Hrvatskoj sadni materijal višnje treba biti testiran samo na virus šarke šljive (*Plum pox potyvirus*, PPV), stabla su dodatno testirana i na navedeni virus. Za dokazivanje većine virusa korištena je tzv. dvostruka protutijelna sendvič ELISA (eng. *double antibody sandwich ELISA*, skraćeno DAS-ELISA) čiji shematski prikaz se nalazi na Slici 4. U navedenom testiranju korišteni su komercijalni ELISA-pribori njemačkog proizvođača LOEWE® Biochemica GmbH. Zbog vrlo oskudnih literaturnih podataka o optimalnom vremenu uzorkovanja za testiranje na viruse (ovisi o promjenjivoj koncentraciji virusa unutar krošnje), ponovno su tijekom studenog 2014.g. odnosno u mirovanju vegetacije sa svih 205 stabala ponovno uzeti uzorci. Uzorci su se u ovom slučaju sastojali od grančica (4 grančice po stablu, po jedna uzeta sa istočne, zapadne, sjeverne i južne strane krošnje) sa kojih je sastrugano floemsko tkivo koje je pomiješano u prosječni uzorak te je on metodom ELISA ponovno analiziran na prisutnost ranije spomenutih 11 virusa.



Slika 4. Shematski prikaz testiranja uzoraka višnje Maraske na prisutnost virusa metodom DAS-ELISA

Elitna stabla u kojima nije utvrđena prisutnost 11 ranije spomenutih virusa u dva roka testiranja dodatno su provjerena na prisutnost četiri virusa metodom lančane reakcije polimeraze nakon obrnutog prepisivanja (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Navedena četiri virusa bila su mali virus trešnje 1 i 2 (*Little cherry closterovirus 1 i 2*, LChV-1, LChV-2), virus šarenila lista trešnje (*Cherry mottle leaf trichovirus*, ChMLV) te virus zelenog prstenastog šarenila trešnje (*Cherry green ring mottle foveavirus*, CGRMV). Također, dva stabla slobodna od svih 15 virusa testirana su na prisutnost bakterija. Bakteriološko testiranje provedeno je u Zavodu za zaštitu bilja pri Hrvatskom centru za poljoprivredu, hranu i selo. Pri tome je korištena metoda uzgoja na hranjivoj podlozi i metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) uz korištenje specifičnih dijagnostičkih početnica. Uzorci su prikupljeni u fazi cvatnje koja se smatra optimalnom za testiranje na bakterije iz roda *Pseudomonas* (Slika 5.).



Slika 5. Uzimanje uzoraka za analize na bakterije iz roda *Pseudomonas*

7.2. Genetičke i pomološke analize

Molekularno–genetičke metode identifikacije sorata zasnivaju se na analizi varijabilnosti nasljedne tvari (deoksiribonukleinska kiselina ili DNK odnosno eng. *deoxyribonucleic acid* ili DNA). Brojnim eksperimentima na različitim vrstama poljoprivrednog bilja je potvrđeno da je DNA molekula vrlo konzervativna i da se unutar normalnih uzgojnih uvjeta putem vegetativnog razmnožavanja prenosi iz generacije u generaciju u pravilu bez utjecaja okolišnih čimbenika (Maletić i sur., 2008). Rezultati analize DNA molekule mogu biti provjereni istom metodom u bilo kojem laboratoriju na svijetu i u bilo kojoj razvojnoj fazi biljke. Postoji više vrsta DNA markera, a za potrebe identifikacije sorata najčešće se koriste SSR markeri (eng. *Simple Sequence Repeats*) odnosno mikrosateliti. Mikrosateliti su specifični dijelovi DNA molekule koji se sastoje iz višestruko ponavljajućih kratkih nukleotidnih nizova pri čemu ponavljajući motivi mogu biti gotovo svi oblici sekvenci: od jednog nukleotida do nekoliko tisuća nukleotida (Ellegren, 2004.). Unutar genoma svih živih organizama ponavljajuće sekvence su vrlo prisutne i raširene. Tipična mikrosatelitska sekvenca se sastoji od pet do otprilike sto ponavljanja osnovnog mikrosatelitskog motiva (npr. (GA)_n). Mikrosatelitski markeri su često korišteni zbog velikog polimorfizma koji je uglavnom uzrokovan varijacijama u dužini ponavljajućeg motiva. Za umnožavanje mikrosatelitskih lokusa potrebno je utvrditi jedinstveni sekvencu u regiji DNA oko ponavljajućeg motiva. Jedinstvena sekvenca pokraj ponavljajućeg (SSR) motiva omogućuje umnažanje samo željenog dijela DNA molekule, tj. specifičnost samo za taj lokus.

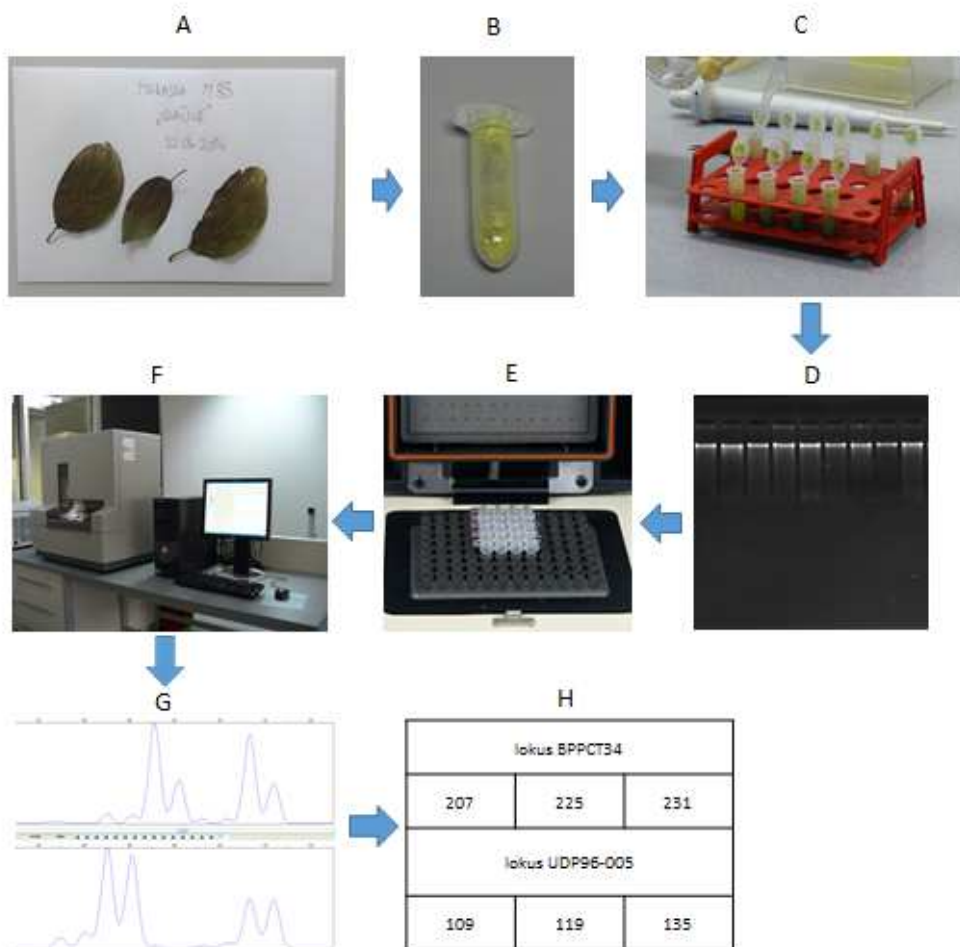
U lipnju te tijekom rujna 2014. god. sa 51 stabla dobrih gospodarskih svojstava (tzv. elitna) uzeti su uzroci listova za genetičke analize te je napravljena procjena tipa rasta (pendula, erekta), bujnost, rodnost i obojenost ploda (Slika 6.). Parametri na koje je obraćena posebna pozornost bili su ujednačeno dozrijevanje, veličina ploda, dužina peteljke te sočnost i jačina arome. Na 11 uzoraka koji su se pokazali bezvirusnima prema testiranjima tijekom vegetacije obavljena je genetička analiza primjenom metode mikrosatelitskih (SSR) markera. Analiza SSR lokusa sastojala se od nekoliko sukcesivnih koraka (Slika 7.). Uzorci listova prikupljeni u nasadu “Vlačine” osušeni su postupkom

liofilizacije čime je iz njih uklonjena sva voda koja nije kemijski vezana (Slika 7. A). Suho stanje omogućilo je da budu samljeveni u fini prah (Slika 7. B) nakon čega je slijedila ekstrakcija DNA prema uputama proizvođača pribora za ekstrakciju. U tu svrhu korišten je PeqGOLD Plant DNA mini kit (Peqlab, Njemačka).



Slika 6. Slikanje listova i uzimanje uzoraka za genetička istraživanja

Nakon ekstrakcije provjerena je količina i kvaliteta dobivene DNA korištenjem agaroznih gelova (Slika 7. D). Lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) korištena je za umnožavanje odabranih mikrosatelitskih lokusa koji se uobičajeno koriste za analize sorata višanja. Ukupno je amplificirano 20 SSR lokusa opisanih u radovima Dirlevanger i sur. (2002), Cipriani i sur. (1999) te Clarke i Tobbut (2009). Nakon reakcije umnožavanja dobiveni produkti su elektroforetski razdvojeni upotrebom kapilarnog sekvencera ABI 3130 Genetix Analyzer (Applied Biosystems, SAD) (slika xy F) te su dobiveni elektroforegrami upotrebom GeneMapper 4.0 (AppliedBiosystems, SAD) softverskog paketa (Slika 7. G). Na kraju je dobiveni SSR profil sorte Maraske uspoređen sa poznatim profilima ostalih do sada analiziranih sorata (npr. Rexelle, Kelleris 14 i 16m, Oblačinska, Cigančica, Kereška, itd.). U lipnju 2015. god., odnosno pred samu berbu, obavljen je dodatni obilazak bezvirusnih stabala te su uzeti uzorci plodova za pomološke i kemijske analize. Na samim stablima ponovo je ocijenjena bujnost, rodnost i tip rasta, a na uzorcima plodova (n=30) napravljena je analiza obojenosti kolorimetrom; izmjerena je masa ploda (g); masa peteljke (g); dužina, širina i visina ploda (mm); dužina peteljke (mm), te je utvrđen sadržaj topive suhe tvari (°Brix), pH vrijednost kao i ukupni sadržaj kiselina.



Slika 7. Uzorci listova uzeti u voćnjaku se suše u liofilizatoru, ustinjavaju u fini prah i koriste u postupku ekstrakcije DNA upotrebom odgovarajućeg pribora (A, B i C). Nakon toga provjerava se koncentracija i kvaliteta DNA na agaroznom gelu (D) i odgovarajuća količina DNA koristi se za umnožavanje SSR lokusa (E). Nakon amplifikacije uzorci se elektroforetski razdvajaju pomoću kapilarnog sekvencera ABI3130 (F) te se veličine alela očitavaju pomoću GeneMapper 4.0 softvera (G). Krajnji rezultat SSR analize je tablica koja čini jedinstveni SSR profil sorte (H).

8. Rezultati

8.1. Rezultati istraživanja zdravstvenog stanja

Metodom ELISA utvrđena je relativno velika pojavnost virusa nekrotične prstenaste pjegavosti trešnje (99 stabala, 48,3%). U znatno manjoj zastupljenosti utvrđeni su: virus zvjezdastog mozaika petunije i virus kržljivosti šljive (10 stabla, 4,9%), virus prstenaste pjegavosti maline (7 stabala, 3,4%), virus uvijenosti lista trešnje, virus mozaika gušarke te virus šarke šljive (po 3 stabla, 1,5%), virus mozaika jabuke (1 stablo, 0,5%). Preostali virusi obuhvaćeni istraživanjem (virus klorotične prstenaste pjegavosti jabuke, latentni virus prstenaste pjegavosti jagode, virus crnih prstenova rajčice) nisu potvrđeni niti u jednom stablu. Uspoređujući rezultate testiranja u vegetaciji (lipanj) i mirovanju vegetacije (studeni) pouzdanijima su se pokazali oni dobiveni testiranjem u mirovanju vegetacije, odnosno u testiranju u kojem je kao potencijalni izvor virusa korišteno floemsko tkivo dobiveno struganjem sa grančica.

Od početnog 51. elitnog stabla nakon provedenih analiza na viruse slobodnim od 11 virusa pokazalo se 17 stabala. Njihovim testiranjem na dodatna četiri virusa metodom RT-PCR uz korištenje specifičnih parova početnica kod još šest stabala utvrđena je prisutnost malog virusa trešnje 2. Tako je u konačnici broj bezvirusnih elitnih stabala slobodnih od 15 virusa iznosio 11.

Simptomi zabilježenih na stablima višnje Maraske zaraženima pojedinim virusima te njihovi opisi nalaze se na slikama od 8 do 15. Međutim, treba naglasiti da sva zaražena stabla nisu iskazivala znakove virusnih infekcija, odnosno kod pojedini stabala očito se radilo o latentnoj zarazi.

Testiranjem dva stabla višnje Maraske na prisutnost bakterija roda *Pseudomonas* na oba su dobiveni negativni rezultati, odnosno nije utvrđena prisutnost jedne od najopasnijih bolesti - bakterijskog raka koštičavih voćaka.



Slika 8. Klorotični prstenovi te nekrotične pjegice na stablu višnje Maraske zaraženom virusom nekrotične prstenaste pjegavosti trešnje (PNRV)



Slika 9. Žućenje i zaostajanje u rastu kao posljedica zaraze višnje Maraske virusom kržljivosti šljive (PDV) – lijevo zaraženo, desno nezaraženo stablo



Slika 10. Rast listova samo na vrhovima grana/mladica kod višnje Maraske zaražene virusom kržljivosti šljive (PDV)



Slika 11. Uvijanje vrha mladice (lijevo) i pucanje kore (desno) na stablu višnje Maraske zaražene virusom zvjezdastog mozaika petunije (PeAMV)



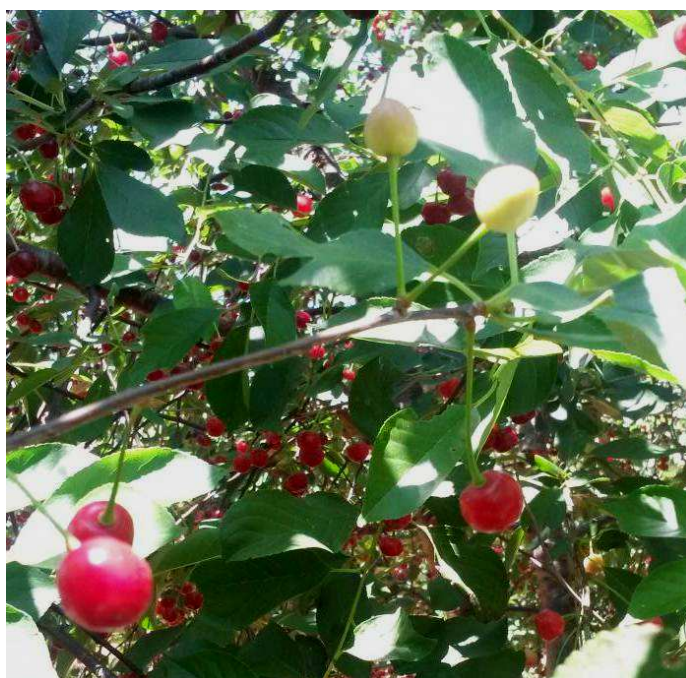
Slika 12. Usporedba veličine listova nezaraženog (desno) i zaraženog (lijevo) stabla višnje Maraske kao posljedica zaraze virusom prstenaste pjegavosti maline (RpRSV)



Slika 13. Mozaične promjene na listovima višnje Maraske zaražene virusom šarke šljive (PPV)



Slika 14. Žute mrlje na listovima višnje Maraske zaražene virusom mozaika jabuke (ApMV)



Slika 15. Neujednačeno dozrijevanje plodova na stablu zaraženom malim virusom trešnje 2 (LChV-2).

8.2. Rezultati genetičkih i pomoloških analiza

U 2014. godini provedena je masovna pozitivna klonska selekcija višnje Maraske. Međusobnom vizualnom ocjenom stabala unutar nasada odabirana su ona koja su imala karakteristike bolje od ostalih unutar nasada. Svojstva koja su se pratila bila su bujnost, rodnost, intenzitet obojenosti i veličina ploda, a ukupno je označeno 51 elitno stablo (stablo sa vizualno boljim karakteristikama). Kod svih promatranih svojstava utvrđena je unutarSORTNA varijabilnost: kod parametra bujnost je 16% stabala pokazivalo slabiju, 43% srednju, a 41% veliku bujnost. Kod 23% stabala zabilježen je sitan plod, 63% stabala je imalo plod srednje veličine, a 14% stabala je imalo krupnije plodove. Zabilježena je i znatna unutarSORTNA varijabilnost u pogledu intenziteta obojenosti plodova.

Nakon provedene analize zdravstvenog statusa kod 11 elitnih stabala utvrđeno je da su slobodna od 15 virusa te su uzorci njihovih listova korišteni za molekularno-genetičke analize. Krajnji rezultat SSR analize je jedinstveni genetički profil sorte Maraska (slika xy H) pri čemu su sva ispitivana stabla imala međusobno jednak profil. Usporedbom dobivenog profila sa onima ostalih sorata (Gaši i sur. 2010.) utvrđeno je da se profil Maraske razlikuje od ostalih ispitivanih (npr. Rexelle, Kelleris 14 i 16, itd.), kao i od sorata karakterističnih za ovu regiju (Kereška, Cigančica, itd.).

U 2015. godini sva stabla slobodna od virusa ponovno su vizualno opisana i ocijenjena istom metodologijom kao i 2014. godine, a dodatno su uzeti i uzorci plodova za detaljne laboratorijske analize (masa ploda, dužina, širina i visina ploda, sadržaj suhe tvari, sadržaj kiselina, randman, itd.). Rezultati navedenih analiza dati će uvid u razinu unutarSORTNE varijabilnosti višnje Maraske te mogu biti polazište za individualnu klonsku selekciju.

8.3. Rezultati pojedinih faza istraživanja

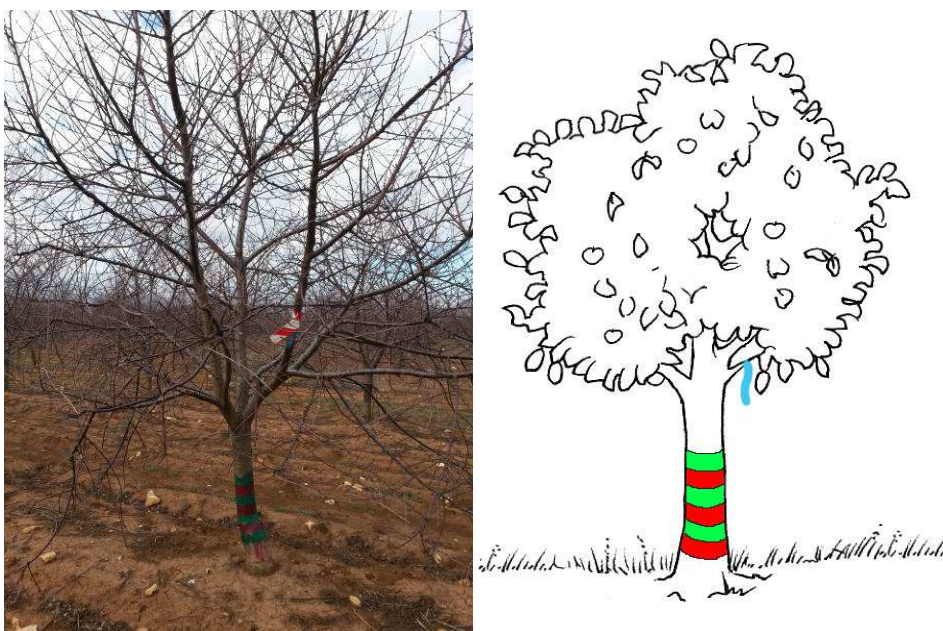
Zbirni prikaz rezultata dobivenih po pojedinim fazama istraživanja pregledno je prikazan u Tablici 2.

Tablica 2. Prikaz najvažnijih rezultata provedenog istraživanja po fazama

I FAZA	Izvršen odabir i obilježavanje 205 stabala po principu 51 lošije, 103 srednja te 51 stablo dobrih proizvodnih svojstava (tzv. elitna stabla) zbog što objektivnijeg dobivanja uvida u zaraženost višnje Maraske virusima. Izvršeno uzimanje uzoraka listova (vegetacija) i grančica (mirovanje vegetacije) za laboratorijsko testiranje na prisutnost virusa te genetičke analize.
II FAZA	Laboratorijskim testiranjem uzoraka na prisutnost 11 virusa metodom ELISA utvrđen visok stupanj zaraze virusom nekrotične prstenaste pjegavosti trešnje (48,3%), a dodatnim testiranjem 17 stabala slobodnih od 11 virusa kod njih šest utvrđena prisutnost malog virusa trešnje 2. Izvršeno uzimanje uzoraka sa 51 elitnog stabla te izrada genetskog profila na 17 bezvirusnih stabla upotrebom mikrosatelitskih (SSR) markera na 8 lokusa pri čemu je utvrđen njihov identičan SSR profil. Utvrđena je velika unutarSORTNA varijabilnost u pogledu bujnosti, krupnoće i obojenosti ploda.
III FAZA	Vizualnim pregledom i laboratorijskim testiranjem kod bezvirusnih stabala nije utvrđena prisutnost bakterija iz roda <i>Pseudomonas</i> . Jedanaest bezvirusnih stabala analizirano na dodatnih 12 SSR lokusa i potvrđen njihov međusobno identičan SSR profil; pred berbu 2015.g. opisane njihove karakteristike te uzeti plodovi za pomometrijske i kemijske analize.

9. Ekonomska korist od realizacije projekta

Prema trenutno važećoj zakonskoj regulativi u Republici Hrvatskoj matične biljke višnje testiraju se samo na virus šarke šljive. Utvrđivanjem jedanaest majčinskih (matičnih) stabala dobrih proizvodnih svojstava slobodnih od 15 virusa (Slika 16.) stvoreni su preduvjeti za značajno poboljšanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske. Proizvodnjom takvog sadnog materijala znatno bi se povećala kvaliteta budućih nasada, koji bi zbog boljeg zdravstvenog stanja trebali biti i otporniji na druge biotske, ali i abiotske čimbenike. Takvi nasadi bi uz dobru agrotehniku trebali davati veće, stabilnije i kvalitetnije prinose. Budući da je osim sanitarne selekcije provedena i djelomična genetička evaluacija kojom su odabrana stabla boljih proizvodnih svojstava (bujnost, rodnost, obojenost plodova) za očekivati je da ovaj projekt pozitivno utječe i na revitalizaciju i podizanje novih nasada višnje Maraske. Osim toga, jedanaest identificiranih bezvirusnih stabala predstavljaju odličan početni materijal za individualnu klonsku selekciju višnje Maraske u budućnosti.



Slika 16. Označavanje stabala slobodnih od 15 virusa: plava etiketa u krošnji te bojanje debla u crvene i zelene pruge

10. Društvena korist od realizacije projekta

Društvena korist od realizacije predloženog VIP projekta je višestruka i za rasadničare i za proizvođače. Budući je projektom odabrano jedanaest bezvirusnih stabala, potencijalnih kandidata za predosnovni matični materijal, rasadničari dobivaju jedan vrlo bitan preduvjet za proizvodnju sadnog materijala po standardima Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO). Samim time rasadničari dobivaju i mogućnost izvoza sadnog materijala ove vrlo cijenjene sorte višnje. Proizvođači bi korištenjem bezvirusnog sadnog materijala trebali postizati veće i stabilnije prinose. Budući da je u današnje vrijeme dominantan način širenja većine virusnih bolesti upravo korištenjem zaraženog sadnog materijal, upotrebom certificiranog materijala usporio bi se njihov prijenos unutar postojećih te unos u nove nasade. Genetičkim analizama uz primjenu mikrosatelitskih (SSR) markera utvrđen je jedinstveni genetski profil višnje Maraske i osigurana sortna čistoća budućeg matičnog nasada. Uzgojem većeg broja bezvirusnih klonskih potomstava (potomstva odabranih stabala) stvoriti će se pretpostavka za provedbu individualne klonske selekcije i daljnje unapređenje proizvodnih karakteristika ove sorte. Genetičkim analizama bezvirusnih kandidata na 20 lokusa primjenom mikrosatelitskih markera dobiven je jedinstveni profil sorte, a samim time stvorena je pretpostavka za prijavu oznake izvornosti.

11. Smjernice za podizanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske

Preduvjet uspješne voćarske proizvodnje je korištenje sortno čistog i zdravstveno provjerenog sadnog materijala. Postupkom masovne pozitivne klonske selekcije i istovremene zdravstvene selekcije osigurava se izvor plemki sigurne sortne pripadnosti i odgovarajućeg (bezvirusnog) zdravstvenog statusa što predstavlja i matični nasad koji će proizaći kao krajnji rezultat ovog projekta. Certificirane sadnice voćaka (plava etiketa), proizvedene pomoću pupova iz certificiranih matičnih nasada plemke, osiguravaju veću sigurnost proizvodnje i prepoznate su na tržištu.

Nastavak započetih istraživanja u smjeru višegodišnje individualne klonske selekcije omogućio bi registraciju klonova Maraske superiornih agronomskih karakteristika koja bi omogućila veću dohodovnost proizvodnje i potencijalno povećanje nasada. Također, uz korištenje bezvirusnog sadnog materijala spriječio bi se unos većine virusa u nove proizvodne nasade te svakako usporilo širenje nekih virusa (prvenstveno onih prenosivih polenom koje je vrlo teško kontrolirati). Napretkom dijagnostičkih metoda (za viruse visokog titra metoda ELISA, a za one nižeg titra metoda lančane reakcije polimeraze nakon obrnutog prepisivanja – RT-PCR) danas je moguće relativno brzo determinirati viruse u biljkama, bilo u pojedinačnim ili mješovitim infekcijama, te ih kao potencijalni izvor zaraze što je moguće prije ukloniti iz nasada.

Istraživanjem su izdvojene biljke koje bi mogle poslužiti kao predosnovni matični materijal. Sukladno preporukama Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja nakon njihovog naciepljivanja na podloge istog zdravstvenog statusa biljke je potrebno držati u uvjetima koji osiguravaju zaštitu od ponovne zaraze bilo korijenskim kontaktom, polenom ili zračnim vektorima te po potrebi provoditi njihovo retestiranje. Osim u zaštićenom prostoru biljke je moguće održavati i na otvorenom, ali moraju biti izolirane barem 1 km od biljnih vrsta roda *Prunus* podroda *Cerasus* te im treba spriječiti cvatnju (zbog virusa prenosivih polenom). U tome slučaju prije podizanja matičnjaka tlo treba testirati na prisutnost nematode iz rodova *Longidorus* i *Xiphinema* te testiranje ponavljati svakih 5 godina. Biljke predosnovnog matičnog materijala svake godine potrebno je retestirati na virus nekrotične prstenaste pjegavosti trešnje i virus kržljivosti šljive (zbog toga što se lako prenose polenom) te virus mozaika jabuke. Osim laboratorijskog testiranja važni su i višekratni vizualni pregledi biljaka na simptome viroza i virozama sličnih bolesti te na ostale ekonomski značajne štetočinke. Biljke koje se pokažu pozitivnima treba odmah odstraniti iz kolekcije predosnovnog matičnog materijala.

12. Objavljeni radovi na osnovu provedenog istraživanja

Vončina, Darko; Šimon, Silvio; Ražov, Josip; Sever, Zdravka; Kaliterna, Joško; Miličević, Tihomir; Vokurka, Aleš; Pejić, Ivan (2015): Poboljšanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske zdravstvenom selekcijom i genetičkom evaluacijom, 50. hrvatski i 10. međunarodni simpozij agronoma, Pospišil, Milan (ur.), Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zbornik sažetaka, 16.-20. veljače, Opatija: 255-256.

13. Održana predavanja i prikazi rezultata istraživanja

Maraska d.d., doc. dr. sc. Darko Vončina i dr. sc. Silvio Šimon, Prezentacija dosadašnjih rezultata VIP projekta, Zadar, 03.12.2014., sufinancijeri, lokalni proizvođači, rasadničari te predstavnici lokalne samouprave Zadarske županije

50. hrvatski i 10. međunarodni simpozij agronoma, doc. dr. sc. Darko Vončina i dr. sc. Silvio Šimon, Poboljšanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske zdravstvenom selekcijom i genetičkom evaluacijom, Opatija, 16-20.02.2015.

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, doc. dr. sc. Darko Vončina i dr. sc. Silvio Šimon, Prezentacija rezultata VIP projekta, Beograd, 19.06.2015., članovi konzorcija za višnju (Srbija, Hrvatska, Bosna i Hercegovina)

Third Balkan symposium on Fruit Growing, prof. dr. sc. Ivan Pejić i dr. sc. Silvio Šimon, Intravarietal Diversity of Sour Cherry Cultivar 'Maraska', Beograd, 18-21 rujan 2015., International Society for Horticultural Science (prijavljeno sudjelovanje)

14. Literatura

- Anonymous (2000). EPPO standards: Schemes for the production of healthy plants for planting - Certification scheme for cherry PM 4/29(1), European and Mediterranean Plant Protection organization.
- Cipriani, G, Lot, G, Huang, W-G, Marrazzo, MT, Peterlunger, E, Testolin, R (1999). AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. Theoretical and Applied Genetics 99: 65–72.
- Clarke, J. B., Tobutt, K. R. (2009). A Standard Set of Accessions, Microsatellites and Genotypes for Harmonising the Fingerprinting of Cherry Collections for the ECPGR. Acta Horticulturae ISHS 814: 615-618.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M. J., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P., & Laigret, F. (2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). Theoretical and Applied Genetics 105: 127-138.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics 5: 435-445.
- Gaši, F., Memić, S., Kurtović, M., Drkenda, P., Memić, S., Skender A., Šimon, S. (2013). Determining the identity of a promising new sour cherry cultivar using SSR markers. The Journal of Ege University Faculty of Agriculture 1: 53-56.
- Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I. (2008.). Vinova loza. Školska knjiga, Zagreb.
- Mandić, B., Matić, S., Al Rwahnih, M., Jelkmann, W., Myrta, A. (2007). Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. Journal of Plant Pathology 89 (1): 103-108.
- Šarić, A., Velagić, Z. (1980). Virus and virus-like diseases of Maraska sour cherry (*Cerasus acida* ssp. Maraska). Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae: 367-369.

[illegible]

This image shows a full page of white paper with horizontal dotted lines, typical of primary school handwriting practice paper. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

ISBN 978-953-7878-37-5



9 789537 878375 >