

Raznolikost mikroflore zaražene vinove loze (*Vitis vinifera*)

Cvitanović, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:499463>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Ana Cvitanović
0058219809**

**RAZNOLIKOST MIKROFLORE ZARAŽENE
VINOVE LOZE (*Vitis vinifera*)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: dr. sc. Iva Čanak

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Raznolikost mikroflore zaražene vinove loze (*Vitis vinifera*)

Ana Cvitanović, 0058219809

Sažetak: Mikroorganizmi prisutni su na površini vinove loze te su mnogi od njih korisni za biljku i sudjeluju u provođenju alkoholne i mliječne fermentacije koje imaju glavnu ulogu u proizvodnji vina. Međutim, određeni mikroorganizmi uzrokuju razne bolesti vinove loze. Suzbijanje bolesti moguće je pomoću različitih fizikalnih, kemijskih i bioloških metoda, no danas je sve veći naglasak na upotrebi bioloških metoda zbog smanjenja štetnih utjecaja na okoliš. Cilj ovog rada bio je klasičnim mikrobiološkim i fenotipskim metodama izolirati i identificirati različite skupine mikroorganizama s listova vinove loze zaražene peronosporom (*Plasmopara viticola*). Porasle kolonije mikroorganizama analizirane su makroskopski i mikroskopski, a čiste kulture kvasaca i bakterija identificirane su API biokemijskim testom. Rezultati izolacije i identifikacije su ukazali na prisutnost plijesni rodova *Trichoderma*, *Aspergillus* i *Fusarium*, kvascaca rodova *Candida* i *Kloeckera* te jednog izolata bakterija mliječne kiseline roda *Lactobacillus*.

Ključne riječi: vinova loza, mikroflora, *Plasmopara viticola*, mikrobiološke analize

Rad sadrži: 30 stranica, 12 slika, 2 tablice, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Iva Čanak

Datum obrane: 16. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Diversity of Microflora in Infected Grapevines (*Vitis vinifera*)

Ana Cvitanović, 0058219809

Abstract: Microorganisms are present on the surface of grapevines. Many of them are beneficial to the plant and participate in alcoholic and malolactic fermentation, which are crucial in wine production. However, certain microorganisms can cause various diseases in grapevines. It is possible to suppress the diseases by using various physical, chemical and biological methods, with increasing emphasis on biological methods to reduce environmental harm. The aim of this study was to isolate and identify different groups of microorganisms from grapevine leaves infected with downy mildew (*Plasmopara viticola*) using classical microbiological and phenotypic methods. The grown colonies of microorganisms were analyzed macroscopically and microscopically, and pure cultures of yeasts and bacteria were identified through the API biochemical test. The isolation and identification results indicated the presence of molds from the genera *Trichoderma*, *Aspergillus*, and *Fusarium*, yeasts from the genera *Candida* and *Kloeckera*, and one isolate of lactic acid bacteria from the genus *Lactobacillus*.

Keywords: grapevines, microflora, *Plasmopara viticola*, microbiological analyses

Thesis contains: 30 pages, 12 figures, 2 tables, 38 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Iva Čanak, PhD

Thesis defended: July 16, 2024.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. VINOVA LOZA	2
2.2. ULOGA RAZNOLIKE MIKROFLORE GROŽĐA.....	3
2.2.1. KVASCI.....	3
2.2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE.....	5
2.2.3. BAKTERIJE OCTENE KISELINE	5
2.2.4. MIKROORGANIZMI KAO UZROČNICI KVARENJA VINA	6
2.3. BOLESTI VINOVE LOZE I MIKROORGANIZMI UZROČNICI.....	6
2.3.1. PLAMENJAČA VINOVE LOZE	8
2.3.2. PEPELNICA	9
2.3.3. SIVA TRULEŽ	9
2.3.4. CRNA PJEGAVOST	11
2.3.5. CRVENA PALEŽ.....	11
2.3.6. BAKTERIJSKE BOLESTI (TUMORI)	12
2.4. METODE PREVENCIJE I SUZBIJANJA BOLESTI VINOVE LOZE	12
2.4.1. FIZIKALNE METODE	13
2.4.2. KEMIJSKE METODE	13
2.4.3. BIOLOŠKE METODE	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. UZORCI	15
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE.....	15
3.1.3. PRIBOR I OPREMA	16
3.2. METODE	16
3.2.1. IZOLACIJE MIKROORGANIZAMA NA HRANJIVIM PODLOGAMA	16
3.2.2. IZOLACIJA ČISTE KULTURE PORASLIH KOLONIJA	17
3.2.3. JEDNOSTAVNO BOJANJE	17
3.2.4. BOJANJE PO GRAMU	17
3.2.5. API 50 CHL BIOKEMIJSKI TEST	18
3.2.6. API 20 C AUX BIOKEMIJSKI TEST.....	18

4. REZULTATI I RASPRAVA	19
5. ZAKLJUČCI	26
6. POPIS LITERATURE	27

1. UVOD

Iako je kultura uzgoja vinove loze poznata tisućama godina te se vinova loza smatra vrlo prilagodljivom biljkom, ona je ipak podložna raznim patogenim mikroorganizmima, pa su bolesti vinove loze i danas glavni problem jer izazivaju oštećenje ploda i smanjenje uroda. Jedna od najčešćih bolesti, posebno u vinogradima Hrvatske, je peronospora koju izaziva oomiceta *Plasmopara viticola*. Za suzbijanje i prevenciju bolesti vinove loze uglavnom se koriste kemijske metode koje su već dobro istražene i učinkovite, no poznat je i njihov negativan utjecaj na okoliš i ljudsko zdravlje (Naher i sur., 2014).

Vinova loza podložna je različitim patogenim mikroorganizmima, no na površini grožđa prisutni su i razni korisni mikroorganizmi koji čine mikrofloru vinove loze. Već dugo su poznati razni mikroorganizmi, bakterije, kvasci i plijesni, koji su prisutni na površini vinove loze, na površini bobica, listova, ali i na površini opreme vinarije, te je opisana njihova uloga u fermentaciji grožđa kao i moguća uloga u kvarenju vina (Grba, 2010).

Alkoholnu fermentaciju uglavnom provodi kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, a spontanu fermentaciju to jest ranu fazu alkoholne fermentacije provode ne-*Saccharomyces* kvasci. Mikrofloru grožđa čine i bakterije mliječne i octene kiseline, pa tako bakterije mliječne kiseline imaju ključnu ulogu u provođenju mliječne fermentacije, dok su bakterije octene kiseline važne za prevođenje dobivenog etanola u octenu kiselinu (Krieger-Weber i sur., 2020; Bartowsky, 2017).

Međutim, neki mikroorganizmi odgovorni su i za kvarenje vina, a jedan od poznatijih je kvasac *Brettanomyces bruxellensis* koji je odgovoran za miris vina po zemlji te bakterija mliječne kiseline vrste *Pediococcus* koja uzrokuje nastanak viskoznog sloja u vinu.

Uzimajući u obzir mali broj dosadašnjih istraživanja cilj ovog završnog rada bio je izolirati i identificirati mikroorganizme prisutne na listovima vinove loze zaražene peronosporom te usporediti s mikroflorom zdravih listova iz postojećih istraživanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Vinova loza

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) tipična je za područje Europe i zapadne Azije, a pretpostavlja se da se razvila iz divlje vrste vinove loze (*Vitis sylvestris*) pomoću procesa domestikacije i hibridizacije zbog čega je divlja loza danas vrlo malo rasprostranjena. *Vitis vinifera* L. svrstava se u rod *Vitis* te u porodicu *Vitaceae* u koju inače spada još devet rodova, no *Vitis* se ističe kao najvažniji rod za gospodarstvo jer su plodovi ovoga roda u širokoj primjeni za proizvodnju vina, prehrambenih proizvoda te farmaceutskih pripravaka (Maletić i sur., 2018).

Uzgoj vinove loze kao i prerada njenih plodova u vino poznata je tisućama godina te postoje razni arheološki dokazi koji to potvrđuju. Neki od njih upućuju na to da su prva vina proizvedena prije 8000 godina na području današnje Gruzije, Armenije i Azerbajdžana, dok drugi pronađeni dokazi potječu s područja današnjeg Irana i stari su oko 7000 godina. Bilo je potrebno tisuće godina da vinogradarstvo i sama proizvodnja vina stignu do Zapadne Europe i ostatka svijeta (Estreicher, 2017).

Vinogradarstvo se na prostoru Hrvatske širilo kontinentalnim i pomorskim putem zahvaljujući utjecaju starih Grka, Feničana i Rimljana koji su trgovali na Jadranu te širili kulturu vinove loze u kolonijama (Maletić i sur., 2018).

Uzgoj vinove loze moguć je u raznolikim klimatskim i okolišnim uvjetima zbog njene vrlo dobre prilagodljivosti. No, postoje određeni uvjeti koji su pogodniji njenom uzgoju, a najvažniji čimbenik je temperatura. Srednja godišnja temperatura u rasponu od 10 do 20 °C smatra se najpovoljnijom, stoga se umjereni klimatski pojas smatra tipičnim područjem za uzgoj. Na područjima bliže polovima zimske temperature su često niske što negativno utječe na pupove i izaziva oštećenja. S druge strane, u područjima bliže ekvatoru uzgoj vinove loze je otežan jer su zimske temperature previsoke te je glavni problem izlaska pupova iz faze dubokog mirovanja (Karoglan Kontić i sur., 2023).

Sve biljke, pa tako i vinova loza sadrže složenu mikrofloru koju čine brojni mikroorganizmi koje možemo podijeliti na neutralne, korisne ili patogene, a oni koloniziraju različite biljne organe i stoga su u stalnoj interakciji s biljkom. Ravnoteža između biljke i mikroorganizama koji čine njenu mikrofloru važni su za zdravlje, rast i razmnožavanje biljke. Bakterije i gljive prisutne su u najvećem broju te mogu kolonizirati filozferu odnosno nadzemne dijelove biljke ili rizosferu koju čine korijenje biljke i tlo oko korijenja. Brojnim istraživanjima, koja su se fokusirala na proučavanje mikroorganizama koji se nalaze u području rizosfere, utvrđeno je da se često u velikom broju pojavljuju isti mikroorganizmi kod različitih biljaka, pa je tako utvrđeno da se

uglavnom pojavljuju bakterije iz obitelji *Pseudomonadaceae* i *Burkholderiaceae*. U području filofsere uglavnom je istraživana mikroflora lišća, no filofsfera u usporedbi s rizosferom sadrži manju količinu hranjivih tvari te su mikroorganizmi koji se nalaze na tim dijelovima biljke izloženi raznim vanjskim stresnim faktorima poput ekstremnih temperatura i UV zračenja. Zbog toga mikroorganizmi prisutni u području filofsere nisu isti kao oni u području rizofsere jer okolišni uvjeti imaju velik utjecaj na raznolikost mikroflore (Pinto i Gomes, 2016).

2.2. Uloga raznolike mikroflore grožđa

Proizvodnja vina kao i općenito alkoholnih pića ima dugu povijest te se zapravo radi o tradicionalnom biotehnološkom procesu. Sam proces proizvodnje nije se značajno promijenio, no danas se koraci u proizvodnji mogu kontrolirati na način da se određuju metode i pogodno vrijeme za berbu grožđa, upotrebljavaju se određeni kvasci i bakterije kao i tehnike zrenja. Različiti kvasci, bakterije i plijesni, koji su prisutni na grožđu i opremi za proizvodnju vina, sudjeluju i imaju važnu ulogu u procesu proizvodnje vina i provođenju fermentacije. Iako su neki mikroorganizmi poželjni i korisni, postoje i mnogi nepoželjni koji uzrokuju kvarenje vina ili loša organoleptička svojstva. Iako proizvodnja vina seže daleko u povijest, sve do prije otprilike 150 godina nije bilo poznato da su kvasci i bakterije ključni u provođenju fermentacije (Bartowsky, 2017).

Louis Pasteur ističe se kao prvi znanstvenik koji je proučavao fermentaciju te je sredinom 19. stoljeća proveo istraživanje o vinskim kvascima. Utvrdio je da su kvasci odgovorni za spontanu fermentaciju mošta u vino te da određene vrste bakterija mogu rasti u vinu i uzrokovati kvarenje. Tijekom istraživanja izolirao je nekoliko vrsta kvasaca te je utvrdio da sama priroda kvasca koji provodi fermentaciju utječe na aromu. Također je dokazao da osim etanola i CO₂ tijekom fermentacije nastaju i različiti sekundarni metaboliti koji utječu na aromu vina poput glicerola (Maicas, 2020). Mikroflora grožđa zapravo se može znatno razlikovati ovisno o utjecaju vanjskih čimbenika kao što su okolišni uvjeti, geografski položaj vinograda, sorta grožđa i upotreba fitokemikalija (Pinto i sur., 2015).

2.2.1. Kvasci

Mikroorganizmi prisutni na površini grožđa i na opremi vinarija važni su za tradicionalni postupak proizvodnje vina jer oni provode alkoholnu i mliječnu fermentaciju. Za provođenje alkoholne fermentacije uglavnom je odgovoran kvasac *Saccharomyces cerevisiae* koji prevodi šećer u etanol pri čemu nastaju i brojni sekundarni metaboliti koji su važni za organoleptičke

karakteristike vina kao što su okus, miris i boja. Osim *S. cerevisiae* u alkoholnu fermentaciju su u različitoj mjeri uključeni i kvasci iz drugih rodova i vrsta. No, važno je istaknuti da kada se bobice grožđa zgnječe i započne spontana fermentacija u najvećem broju su prisutni ne-*Saccharomyces* kvasci. Dakle oni dominiraju tijekom rane faze alkoholne fermentacije i tada je snaga fermentacije niska (Tufariello i sur., 2021). U ranim do srednjim fazama fermentacije, uz ostale ne-*Saccharomyces* rodove kvasaca, uglavnom su u najvećem broju prisutne *Kloeckera apiculata* i *Candida stellata* (Fugelsang i Edwards, 2007). Djelovanje ne-*Saccharomyces* kvasaca je značajno u prvom dijelu alkoholne fermentacije, no već za par dana kada koncentracija alkohola iznosi oko 4 % (v/v) većina ovih kvasaca ne preživljava zbog veće osjetljivosti na etanol u odnosu na kvasce iz roda *Saccharomyces*. Zbog značajnog smanjenja njihove populacije počinju prevladavati kvasci iz roda *Saccharomyces* koji zatim provode konačan korak alkoholne fermentacije. Oni za razliku od ne-*Saccharomyces* kvasaca podnose veće koncentracije etanola i provode snažnu fermentaciju to jest imaju veću učinkovitost. U prošlosti su se ne-*Saccharomyces* kvasci smatrali „lošim vrenjačama“ zato što je njihova učinkovitost provođenja fermentacije niska te su se smatrali odgovornima za visoku kiselost, neugodan okus i kvarenje vina. No, najnovija istraživanja upućuju da upotreba samo *S. cerevisiae* može dovesti do smanjenja poželjnih organoleptičkih svojstava vina te da se poželjna aromatična svojstva dobivaju upravo tijekom spontanog vrenja kojeg pokreću ne-*Saccharomyces* kvasci (Tufariello i sur., 2021).

S obzirom na navedeno, kvasce koji sudjeluju u fermentaciji grožđa možemo podijeliti u tri kategorije:

a) kvasci u vinariji – to su kvasci koji se nalaze na grožđu, u vinu, a mogu se naći i na opremi vinarija jer površina opreme vinarije dolazi u kontakt s moštom i vinom. Na površini opreme u vinarijama uglavnom prevladava kvasac vrste *S. cerevisiae*.

b) divlji kvasci – to su kvasci koji ne spadaju u rod *Saccharomyces* (ne-*Saccharomyces*) i sudjeluju u početku fermentacije. Mogu imati štetan utjecaj na vino ako u njemu ostanu prisutni i nakon završene proizvodnje, što ovisi o higijeni vinskih podruma, stupnju filtracije prije buteljiranja i upotrijebljenoj količini SO₂. To su rodovi *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Brettanomyces*, *Dekkera* i *Zygosaccharomyces*.

c) plemeniti kvasci – to su sojevi kvasaca iz roda *Saccharomyces* koji mogu provesti potpunu fermentaciju mošta, a vinu daju poželjna organoleptička svojstva. Osim kvasaca iz roda *Saccharomyces* potpunu fermentaciju mošta mogu provesti i kvasci iz roda *Schizosaccharomyces* (Grba, 2010).

2.2.2. Bakterije mliječne kiseline

Osim kvasaca, bakterije mliječne kiseline (BMK) su također dio mikroflore grožđa te su odgovorne za provođenje mliječne fermentacije. Mliječna fermentacija je proces u kojemu se odvija dekarboksilacija L-malatne kiseline u L-mliječnu kiselinu i CO₂. Ustanovljeno je da su četiri glavna roda bakterija mliječne kiseline odgovorna za provođenje mliječne fermentacije, a to su *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Pediococcus*. Pri pH nižem od 3,5 samo sojevi bakterije *Oenococcus oeni* mogu preživjeti i provoditi mliječnu fermentaciju zbog čega se ovi sojevi smatraju najprilagođenijima teškim uvjetima okoliša, a upravo zbog toga komercijalne starter kulture za mliječnu fermentaciju uglavnom sadrže upravo ovu vrstu bakterije. Mliječna fermentacija može započeti tijekom ili nakon alkoholne fermentacije, a obično ju provodi jedna ili više vrsta bakterija mliječne kiseline. Ona započinje nakon što se bobice zgnječe, pa različite bakterije mliječne kiseline s površine grožđa, peteljki, listova, tla te s opreme vinarije mogu dospjeti do grožđanog soka. U usporedbi s kvascima i velikom brojnosti vrsta koje čine mikrofloru grožđa, raznolikost vrsta bakterija mliječne kiseline koje se nalaze na površini grožđa je ograničena zbog njihovih nutritivnih zahtjeva. Na površini grožđa češće su prisutni rodovi *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus* nego vrsta *O. oeni*. Stoga su na početku alkoholne fermentacije uglavnom prisutni rodovi *Lactobacillus* i *Pediococcus* čija se populacija s vremenom smanjuje zbog sve većih koncentracija etanola, visokih koncentracija SO₂ te nekih drugih čimbenika. Iz tog razloga je *O. oeni* glavna vrsta bakterije mliječne kiseline koja provodi spontano mliječnu fermentaciju, iako su u manjoj količini prisutne i preostale tri prethodno spomenute vrste (Krieger-Weber i sur., 2020). Mliječna fermentacija korisna je u procesu vinifikacije jer omogućava mikrobiološku stabilnost vina tako što uklanja fermentabilni izvor ugljika, smanjuje kiselost povećavajući pH vina za 0,2-0,5 jedinica te uzrokuje razne promjene senzornih svojstava što uključuje npr. pojačanje voćnih aroma u vinu (Bartowsky, 2017).

2.2.3. Bakterije octene kiseline

Osim bakterija mliječne kiseline, važnu ulogu imaju i bakterije octene kiseline poput vrsta *Acetobacter* i *Gluconobacter* koje vrše pretvorbu etanola u acetaldehid i na kraju u octenu kiselinu. Vina koja sadrže ove bakterije mogu mirisati po octu zbog prisutnog acetaldehida ili kao odstranjivač laka zbog prisutnosti etilacetata. Radi se o aerobnim bakterijama, pa se njihov rast može spriječiti ili smanjiti na način da se osigura redovito dopunjavanje bačvi, održava koncentracija SO₂ te da se smanji prisutnost kisika tijekom skladištenja vina (Bartowsky, 2017).

2.2.4. Mikroorganizmi kao uzročnici kvarenja vina

Kvasci, bez obzira na prethodno spomenute pozitivne učinke, mogu djelovati i štetno te uzrokovati kvarenje vina. Jedan takav kvasac je *Brettanomyces bruxellensis* koji može preživjeti u vinu dugo vremena nakon alkoholne fermentacije, a njegovom razmnožavanju posebno pogoduje odležavanje vina u hrastovim bačvama. Ovaj kvasac ima razne negativne učinke na vino, poput sinteze 4-etilfenola i 4-etilgvajakola, spojeva koji vinu daju miris po fenolu i zemlji (Bartowsky, 2017).

Nakon završetka alkoholne i mliječne fermentacije u vinu su i dalje prisutne male količine glukoze, fruktoze i arabinoze, a te šećere mogu koristiti bakterije mliječne kiseline za razmnožavanje. Njihov rast u vinu rezultira kvarenjem vina i može uzrokovati mutnoću, povećanu količinu octene kiseline te viskoznost (Fugelsang i Edwards, 2007).

Jedan od primjera je BMK vrste *Pediococcus* koja nije poželjna u vinu jer može proizvesti velike količine egzopolisaharida poput β -D-glukana, za koje je karakteristično da stvaraju viskozni debeli sloj zbog čega je vino vidljivo gušće. Kvarenje vina uzrokovano vrstom *Pediococcus* specifično je za vina visokog pH (Bartowsky, 2017).

2.3. Bolesti vinove loze i mikroorganizmi uzročnici

Bolesti vinove loze mogu biti uzrokovane različitim čimbenicima poput mikroorganizama, virusa, viroida ili abiotskih čimbenika (temperatura, pH vrijednost tla, količina svjetlosti). Stoga, obzirom na čimbenike koji uzrokuju bolest na vinovoj lozi, bolesti možemo podijeliti na parazitske bolesti koje su uzrokovane mikroorganizmima ili virusima i neparazitske bolesti koje nastaju djelovanjem abiotskih čimbenika. Neovisno o tome koji je uzrok bolesti, kod bolesnih biljaka javljaju se poremećaji u iskorištavanju hranjivih tvari, dobavljanju vode i mineralnih tvari te poremećaji u sintezi i translokaciji, a to dovodi do promjena u histološkoj građi i vanjskom izgledu biljke te do fizioloških poremećaja. Neparazitske bolesti uzrokovane su nedostatkom ili viškom vlage, niskim ili povišenim temperaturama, manjkom ili viškom svjetlosti, olujnim vjetrovima te raznim drugim nepovoljnim uvjetima u okolišu (Cvjetković, 2006). Ove bolesti mogu rezultirati pojačanom osjetljivošću biljke na patogene mikroorganizme, a to posebno dolazi do izražaja u stresnim uvjetima. Također je važno istaknuti da neparazitske bolesti nisu infektivne što znači da se ne šire s bolesne biljke na zdravu biljku za razliku od parazitskih bolesti. Na biljci koja je inficirana javljaju se znakovi bolesti koji mogu biti manje ili više specifični za određenu bolest, pa po njima možemo lakše ili nešto teže prepoznati o kojoj se

bolesti radi. Ponekad je teže prepoznati uzročnika bolesti jer različiti patogeni mikroorganizmi mogu izazvati iste ili vrlo slične promjene na biljci, pa je tada potrebna laboratorijska analiza zaraženih dijelova biljke. Važno je prepoznati simptome bolesti i utvrditi o kojoj bolesti je riječ kako bi se poduzele potrebne mjere zaštite (Cvjetković, 2006).

Tablica 1. Ključ za prepoznavanje bolesti (Cvjetković, 2006)

Promjene na lišću	
Plamenjača	Uljane mrlje, kasnije crvenkasto smeđe pjege, ispod njih na naličju bijela prevlaka
Pepelnica	Na gornjoj strani plojke pepeljasta prevlaka
Crna pjegavost	Na plojci sitne žute pjege, plojka deformirana
Crvena palež	Na plojci trokutaste pjege omeđene glavnim žilama, bez bijele prevlake, u bijelih sorti žute pjege, u crvenih sorti crvenkaste pjege
Promjene na cvjetovima	
Plamenjača	Na cvjetovima i grozdiću bijela prevlaka, cvjetovi i grozdići pocrne i osuše se
Promjene na peteljkovini	
Siva plijesan	Tkivo smeđi i trune
Promjene na bobama	
Plemenjača	Bobe do veličine graška prekrivene bijelom prevlakom, veće bobe smežurane, kožaste i suhe, nema bijele prevlake
Pepelnica	Na bobama pepeljasta prevlaka, bobe pucaju
Siva plijesan	Bobe trunu, pokrije ih siva paučinasta prevlaka
Promjene na izbojima	
Crna pjegavost	Na prvim nodijima crne duguljaste upale pjege, koje se spajaju, kora rozgve ima srebrenastu boju, na kori se vide crne točkice
Pepelnica	Mladice pokrivene pepeljastom prevlakom, na kori rozgve mrlje čokoladne boje
Promjene na cijelom čokotu	
Bakterijske bolesti – tumori	Raspucala kora s rakastim nabrekliinama

2.3.1. Plamenjača vinove loze

Plamenjača je bolest vinove loze koju uzrokuje oomiceta *Plasmopara viticola*. Ova bolest je autohtona za Sjevernu Ameriku te je slučajno proširena u europske vinograde krajem 19. stoljeća, a s obzirom na to da je europska loza osjetljivija na bolesti nastale štete bile su velike. Područja gdje su količine oborina u proljeće i ljeto male ili se u proljeće ne postižu dovoljno visoke temperature nisu pogodna za rast *P. viticola*. Plamenjača inficira sve zelene dijelove vinove loze, a najčešće list i bobice, rjeđe cvijet i gotovo nikada vitice i mladice. Međutim, utvrđeno je da je lišće glavni izvor spora zbog njihove velike površine, volumena stanica za rast haustorija, količine i strukture stoma te nedostatka obrambenih mehanizama za zaštitu od patogena. Kod inficirane biljke javlja se promjena boje listova, nekroza i opadanje lišća. Sve navedeno dovodi do smanjenja koncentracije hranjivih tvari, smanjenja skupljanje šećera u bobicama i smanjene sposobnosti pupova da prežive zimu i općenito dolazi do smanjenja uroda (Koledenkova i sur., 2022).

P. Viticola zahtjeva zeleno tkivo vinove loze kako bi završila svoj životni ciklus te su joj kao oomiceti potrebni vlažni uvjeti za život i razmnožavanje. Oospore prežive zimu u biljnom otpadu i tlu, a zatim u proljeće kada uvjeti postanu povoljni počinju klijeti. Potrebni su vlažni uvjeti i temperature iznad 10 °C kako bi se oospore razvile u mikrosporangije, a iz njih se oslobađaju aseksualne zoospore. Oospore mogu više godina preživjeti u tlu što znači da preživljavaju različita godišnja doba zbog otpornosti na niske temperature, sušu i na veliku vlagu. S obzirom na sve navedeno ovaj proces može se ponavljati više puta tijekom vegetacijske sezone sve dok su uvjeti takvi da potiču klijanje oospora i razvoj patogena. Zbog te činjenice moguće je da plamenjača uzrokuje infekcije vinove loze u vinogradima čak i nakon poprilično suhe godine (Clippinger i sur., 2024).

Kada stupe u kontakt s tkivom domaćina to jest s tkivom vinove loze, zoospore uzrokuju infekciju. Stvaraju klicne cijevi koje invadiraju domaćina putem stomata i koloniziraju parenhim lista s tubularnim micelijem. Tubularni micelij koristi haustorije kako bi iz stanica domaćina crpio hranjive tvari. Tijekom rasta tubularnog micelija nema vidljivih simptoma bolesti na biljci, već tek nakon 7 do 10 dana dolazi do razvoja simptoma primarne infekcije na unutarnoj strani listova u obliku žutih "uljnih mrlja" (slika 1). Kasnije kako bolest napreduje mrlje poprimaju smeđu boju. U periodu visokih temperatura i vlažnih uvjeta sporangiji izlaze kroz stomate to jest pore na listovima te ispod uljnih mrlja tvore bijele prevlake (slika 1). Sporangiji su odgovorni za proizvodnju zoospora koje se pomoću kiše i vjetrova oslobađaju i započinju sekundarnu infekciju zbog čega oštećenja na listovima uzrokuju prijevremeno otpadanje lišća (Koledenkova i sur., 2022).



Slika 1. Prikaz žutih „uljnih mrlja“ (lijevo) i bijelih prevlaka (desno) (Taylor, 2021)

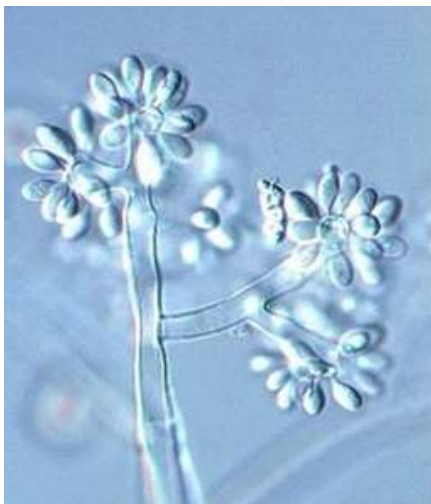
2.3.2. Pepelnica

Pepelnica je gljivična bolest grožđa koja je rasprostranjena širom svijeta, a uzrokuje ju gljiva *Erysiphe necator* koja oštećuje usjev te rezultira smanjenjem prinosa kao i smanjenjem kvalitete vina. Glavni simptom bolesti je pepeljasta prevlaka koja se razvija na površini listova i bobica, a prevlaku stvaraju micelij gljive i konidije. Različite sorte vinove loze su manje ili više osjetljive na ovu bolest, a pojava bolesti ovisi i o klimatskim uvjetima, pa kada su topli i vlažni pogoduju razvoju pepelnice. Ova gljivična bolest može zahvatiti bilo koji zeleni organ biljke vinove loze uključujući listove, bobice i izboje (Pérez-Roncal i sur., 2020). Tijekom zime *E. necator* može preživljavati u obliku kleistotecija (seksualnih plodnih tijela) ili u obliku micelija. Ove strukture mogu preživjeti nepovoljne uvjete tijekom duljeg perioda. Unutar kleistotecija nalaze se askusi s askosporama i glavna važnost kleistotecija je što u proljeće kada su uvjeti za to povoljni dolazi do oslobađanja askospora. Povoljni uvjeti za rastvaranje kleistotecija uključuju temperaturu između 6 °C i 24 °C te kišne uvjete. Raspršivanjem, askospore dospijevaju do zelenih dijelova vinove loze i inficiraju ih. To označava početak bolesti i razvoj primarne infekcije koju uzrokuju askospore, a zatim će uslijediti višestruke sekundarne infekcije koje uzrokuju aseksualne spore to jest konidije (Ruano-Rosa i sur., 2022).

2.3.3. Siva trulež

Botrytis cinerea je polifagna gljiva koja djeluje kao parazit na raznim biljnim vrstama i uzrokuje sivu trulež. Njeno ime govori puno o izgledu same plijesni s obzirom na to da „botrys“ na grčkom znači grozd grožđa i opisuje raspored aseksualnih spora (konidija) na konidioforu (Slika 2), a "cinereus" na latinskom znači pepeljasto-siva što opisuje boju same plijesni. Na površini grožđa ova plijesan formira plavo-sivi film te ovisno o klimatskim uvjetima može biti

odgovorna za dva različita učinka od kojih je jedan nepoželjan, a drugi poželjan za proizvodnju ledenih sorti vina. Siva plijesan ne izaziva probleme samo u vinogradarstvu, već može zaraziti različite poljoprivredne kulture poput uljane repice, suncokreta i rajčica (Hornsey, 2007).



Slika 2. *B. cinerea* - konidiofor s grupiranim konidijama u obliku grozda
(Jayawardena i sur., 2018)

B. cinerea uzrokuje sivu trulež na vinovoj lozi, no u određenim klimatskim uvjetima može uzrokovati i plemenitu trulež na bobicama grožđa koje se tada mogu koristiti za proizvodnju visokokvalitetnih slatkih vina. Kada se na vinovoj lozi razvije siva plijesan to smanjuje količinu bobica, ali i kvalitetu vina. Patogen može uzrokovati i inhibiciju procesa fermentacije jer proizvodi toksične spojeve koji utječu na rast kvasaca. Razvoju plemenite truleži je proces koji traje 15 do 20 dana pri čemu dolazi do transformacije bobice prodiranjem *B. cinerea* kroz stome i rane na površini grožđa. Time se permeabilizira kožica grožđa što potiče gubitak vode i povećanje koncentracije šećera, a proces završava enzimskom maceracijom (Negri i sur., 2017). Na kraju procesa zbog visoke koncentracije šećera zaustavljen je daljnji razvoj kvasaca, a razvijena plemenita trulež daje posebnu kompoziciju bobicama koja se razlikuje od nezaraženih bobica. Plemenita trulež povezuje se s poželjnim aromatskim svojstvima vina uslijed proizvodnje jakih mirisnih spojeva poput laktone i vanilina.

Hoće li doći do razvoja sive truleži ili plemenite truleži ovisi o klimatskim uvjetima, pa visoka vlažnost i obilne kiše potiču razvoj sive truleži. S druge strane, razvoju plemenite truleži pogoduju vlažne noći, česte jutarnje magle te suhi sunčani dani jer takvi uvjeti potiču sporu infekciju (Negri i sur., 2017).

2.3.4. Crna pjegavost

Iako je tradicionalno još uvijek uvriježeno da je uzročnik crne pjegavosti *Phomopsis viticola*, danas se smatra da to nije tako. U posljednjih desetak godina provedena su istraživanja koja su istaknula kako je nekoliko vrsta gljiva iz roda *Diaporthe* povezano s crnom pjegavosti, no *Diaporthe ampelina* je najzastupljenija. Crna pjegavost je gljivična bolest koja uglavnom inficira izdanke i listove, no moguće je da se zaraza proširi na sve zelene dijelove vinove loze. Simptomi koji se javljaju na izdancima uključuju nastajanje malih crnih nekrotičnih tkiva koja se zatim razvijaju u lezije eliptičnog oblika. Ako se infekcija razvije i izdanci poprime sivu boju, onda se tijekom zime i proljeća na njihovoj površini razvijaju plodna tijela gljive to jest piknidi. Ako su napadnuti listovi onda se na njima tijekom rane sezone stvaraju svijetlozelene lezije koje kasnije u sredini poprimaju crnu boju, a rubovi lezija su žute boje. Bolest može zahvatiti i bobice, pa se inficirane bobice prepoznaju po smeđoj boji te tijekom sazrijevanja zbog zaraze venu. Kako bi *D. ampelina* preživjela tijekom zime nalazi se u lezijama koje se razvijene na uspavanim izdancima to jest izdancima koji su bili zaraženi još tijekom prethodne sezone. Kada nastupi proljeće pikindi proizvode dva tipa konidija koje se razlikuju po obliku, a nazivaju se alfa i beta konidijama. Proizvodnja alfa konidija odvija se u periodu od klijanja pupova do kratko nakon završetka cvatnje. Važno je istaknuti da alfa konidije inficiraju listove i izdanke, dok je uloga beta konidija još uvijek nepoznata. Bolest se odvija u jednoj fazi to jest tijekom sezone dolazi do nekoliko primarnih infekcija, no sekundarne infekcije nisu zabilježene (Gonzalez-Dominguez i sur., 2022).

2.3.5. Crvena palež

Za crvenu palež je karakteristično da se javlja uglavnom u vinogradima koji se nalaze u toplim krajevima i u kojima je tlo kameno. Stoga je moguće da na nekim područjima ova bolest izazove ozbiljna oštećenja vinograda ovisno o temperaturi i vlažnosti tijekom proljeća, a negdje drugo se uopće ne pojavljuje. Ovu bolest uzrokuje gljivica *Pseudopeziza tracheiphila* iz porodice *Helotiaceae*. Na početku su promjene na listovima prisutne u obliku žutih pjega na bijelim sortama te u obliku crveno smeđih pjega na listovima crvenih sorti grožđa. Nakon toga se u središtu ovih lezija razvija smeđa nerkoza tako da između smeđe nerkoze i zelenog područja lista ostaje samo tanka linija ranije razvijene žute ili crveno smeđe pjege. Rane infekcije javljaju se na listovima mladih izdanaka što rezultira manjim gubitcima, no kasnije infekcije mogu izazvati ozbiljno osipanje lišća. Osim listova, patogen napada cvat i bobice što rezultira njihovim truljenjem i sušenjem (König i sur., 2017). *P. tracheiphila* prezimljuje u

otpalom lišću zaraženom još od prethodne godine. Na tom lišću se tijekom kasnog proljeća razvijaju apoteciji točnije manja plodišta žute boje u kojima su prisutni askusi. Iz askusa se razvijaju askospore koje se oslobađaju iz plodišta te nošene vjetrom ili kišom dolaze do dijelova biljke vinove loze na kojima uzrokuju infekciju (Fischer, 2022).

2.3.6. Bakterijske bolesti (tumori)

Tumore vinove loze uzrokuje bakterija *Agrobacterium tumefaciens* koja može napadati i veliki broj različitih biljaka te voćke i šumsko drveće. Nakon infekcije ovom bakterijom nastaje tumorska izraslina koja se može razviti na stablu čokota, na krakovima, rozgvi i korijenju. Kod većine drvenastih biljaka tumor se razvija uglavnom u području vrata korijena ili u području korijena, a kada je inficirana vinova loza tumor se većinom razvija na nadzemnim organima poput krakova i lucnjeva. Tumor koji nastaje ima loptasti ili izduženi oblik te je na samom početku manji, a kasnije raste, postaje mekan i poprima žutu do blago smeđu boju. Što je tumor stariji njegova boja je sve sličnija smeđoj boji, povećava se njegova tvrdoća i površina mu postaje hrapava (Cvjetković, 2006). Za bakteriju je karakteristično da napada rane zbog čega je moguće da vinovu lozu inficira na mjestu cijepa. Također je moguće da rane na lozi nastanu zbog tuče, niskih temperatura te pri obradi tla ili prolasku strojeva. Novi tumori koji nastaju u proljeće obično se stvaraju blizu starih tumora, a kasnije se njihov razvoj širi i dalje. Kako bi bakterija preživjela zimu ostaje dublje u tkivima, a zbog raspada tumora može dospjeti u tlo gdje i nakon više od godinu dana može djelovati kao izvor zaraze. Koliko dugo *A. tumefaciens* može preživjeti u tlu ovisi o nekoliko čimbenika kao što su tip tla, vlažnost zraka i pH tla, pri čemu pH tla ima ipak slabiji utjecaj. Optimalni uvjeti za razvoj bakterije su temperatura između 25 °C i 30 °C te relativna vlažnost zraka 80 %. Nakon što bakterija inficira biljku slijedi razdoblje inkubacije koje može trajati dugo zbog čega je moguće da do pojave tumora dođe i dva mjeseca nakon infekcije (Cvjetković, 2006).

2.4. Metode prevencije i suzbijanja bolesti vinove loze

S obzirom na velik broj različitih bolesti koje redovito napadaju vinovu lozu potrebno je provoditi metode koje će spriječiti ili smanjiti pojavu bolesti kako bi se spriječilo uništavanje usjeva. Zbog toga su razvijena različita rješenja koja uključuju fizikalne, kemijske i biološke metode. Kemijski agensi koji se primjenjuju mogu biti štetni za prirodu i okoliš, pa se danas pokušavaju naći zamjene za takve agense istražujući sve više područje bioloških metoda koje se temelje na upotrebi mikroorganizama.

2.4.1. Fizikalne metode

Fizikalne metode koje se koriste za suzbijanje biljnih bolesti uključuju primjenu svjetlosti, topline, zvuka, radijacije ili nekog drugog oblika energije. Za sada nisu u širokoj upotrebi, no neke od fizikalnih metoda su u završnim fazama istraživanja i pokazuju velik potencijal (Ivić, 2014). Primjerice tretman toplom vodom pokazao se djelotvornim u smanjenju endogenih infekcija svih bolesti koje napadaju deblo vinove loze, ali i drugih patogena. Međutim, neka istraživanja pokazala su da standardni tretman toplom vodom koji se provodi pri 50 °C tijekom 30 minuta nije u potpunosti iskorijenio patogene i da nije dovoljan za eliminaciju gljivica koje su u fazi mirovanja tijekom zimskog perioda. Zbog toga je potrebno dodatno istražiti samostalnu primjenu ovog tretmana, a do sada je utvrđeno da se ovaj tretman može uspješno koristiti u kombinaciji s fungicidima. Toplinski tretman može povećati uspješnost prodiranja fungicida u biljno tkivo, pa je na taj način djelovanje fungicida pojačano (Görür i Akgül, 2019).

2.4.2. Kemijske metode

Od kemijskih pripravaka za suzbijanje biljnih bolesti koriste se razni fungicidi i bakteriocidi. Primjena sumpora i bakrova sulfata, koji se mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji s vapnom koje poboljšava njihov učinak, označila je početak kontrole gljivičnih bolesti pomoću kemijskih metoda. Elementarni sumpor tradicionalno se koristi kao fungicid, a učinkovito djeluje protiv pjegavosti koja se javlja na lišću vinove loze kao i protiv brojnih gljivičnih bolesti. Kada se vapno kombinira sa sumporom dobivaju se razni spojevi poput kalcijeva tiosulfata koji su učinkoviti protiv pepelnice vinove loze. Protiv plamenjače i pepelnice vinove loze vrlo učinkovito se pokazala bordeaux mješavina koja se dobiva od modre galice i kalcijevog hidroksida. Važno je da se mješavina uvijek svježe priprema jer tijekom stajanja formira kristale te gubi fungicidna svojstva (Malviya, 2020).

Cilj je kontrolirati razvoj biljnih bolesti kako bi se poboljšali prinosi, no tradicionalne metode koje uključuju kemijske pesticide, herbicide i gnojivo nisu prihvatljivi s ekološkog gledišta.

Navedeni pripravci često u svojim strukturama sadrže razne aromatske skupine, metilne i etilne skupine koje u velikim količinama mogu imati štetno djelovanje na okoliš pogotovo u slučaju dugotrajne uporabe kemijskih pesticida. Neke od negativnih posljedica na okoliš su onečišćenje vode, i zagađenje atmosfere, a osim toga moguće je da u prirodi zaostanu štetni ostaci ovih pripravaka koji mogu dovesti do razvoja rezistentnih patogenih mikroorganizama. Kako bi se ovakvi problemi izbjegli potreban je razvoj novih metoda koje su ekološki održive, pa je jedna od alternativa upotreba biokontrolnih agenasa koji se mogu upotrebljavati samostalno ili u kombinaciji s kemijskim agensima (Naher i sur., 2014).

2.4.3. Biološke metode

U komercijalnoj upotrebi su biološki pripravci koji se nazivaju mikrobiološki fungicidi ili kraće biofungicidi, a njihovu osnovu čine mikroorganizmi poput gljiva, pseudogljiva i bakterija. Mikroorganizmi koji se koriste za pripravu ovih bioloških pripravaka djeluju na patogene gljive tako da sprečavaju ili smanjuju njihov rast, odnosno imaju antagonističko djelovanje. Biofungicidi se mogu podijeliti u dvije skupine s obzirom na to što je korišteno kao osnova tijekom njihovog pripravljanja, stoga razlikujemo mikofungicide i bakteriofungicide. Kako bi se dobili bakteriofungicidi uglavnom se koriste bakterije iz rodova *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Streptomyces*, a u proizvodnji mikofungicida koriste se gljive raznih rodova poput gljiva iz rodova *Ampelomyces*, *Pythium* i *Trichoderma* (Miličević, 2020).

Među svim navedenim agensima najčešće se koristi *Trichoderma spp.* koja je prisutna u velikom broju u poljoprivrednom tlu i u dijelovima trulog drveta, te koja može kontrolirati rast velikog broja različitih patogenih mikroorganizama. Njeno djelovanje očituje se kroz različite mehanizme kojima djeluje kao mikoparazit, a ti mehanizmi uključuju kompeticiju za hranjive tvari, hiperparazitizam (djeluje kao parazit na drugog parazita), antibiozu (proizvodi tvari koje su toksične za patogene mikroorganizme) te sintezu enzima koji razgrađuju staničnu stijenku patogenih mikroorganizama. Jedan od primjera je *Trichoderma harzianum* koja se koristi kao biokontrolni agens zbog svojih dobrih svojstava, a najvažnije svojstvo je jednostavnost izolacije te mogućnost rasta na raznim organskim materijalima. Osim samostalne primjene moguće je i miješanje dvaju ili više agenasa, pa se zajedno mogu koristiti *T. harzianum* i *Trichoderma viride* što može rezultirati pojačanjem ili smanjenjem učinkovitosti djelovanja protiv patogena. Zbog toga je važna usklađenost i kompatibilnost između agenasa koji se zajedno primjenjuju kako bi se izbjeglo neželjeno smanjenje djelovanja na patogene mikroorganizme. U jednom od istraživanja tijekom dvije godine korištena je kombinacija agenasa *T. harzianum*, *Trichoderma hamatum* i *T. viride* koja je u obje godine pokazala visoku učinkovitost (80,16 % i 89,95 %) protiv pepelnice uzrokovane gljivicom *E. necator* (Ahmed, 2018).

Današnji napredak u otkrivanju sve većeg broja mikroorganizama koji mogu djelovati kao biofungicidi vidljiv je i u činjenici da su na tržištu već dostupni biofungicidi na osnovi raznih sojeva *Bacillus sp.* Među njima ističe se biofungicid na osnovi *Bacillus subtilis* koji se primjenjuje za suzbijanje bolesti koju uzrokuje *B. cinerea* te biofungicid na osnovi *Bacillus pumilis* koji se koristi za kontrolu pepelnice vinove loze (Kuzmanovska i sur., 2023).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Zaraženi listovi vinove loze (*Vitis vinifera* L.) dobavljeni su iz vinograda u Lombardiji. Do mikrobioloških analiza čuvani su u hladnjaku na +4 °C.

3.1.2. Hranjive podloge

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- MRS agar (De Man, Rogosa i Sharpe) sastava: pepton 10,0 g/l; goveđi ekstrakt 10,0 g/l; ekstrakt kvasca 5,0 g/l; glukoza 20,0 g/l; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 g/l; natrijev acetat 5,0 g/l; amonijev citrat 2,0 g/l; magnezijev sulfat 0,2 g/l; manganov sulfat 0,05 g/l; agar 15,0 g/l; Tween 80 1,0 g/l otopljeni u destiliranoj vodi; pH vrijednost podloge je 6.5; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven u Petrijeve zdjelice.
- MRS bujon- istog sastava kao MRS agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/15 min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.

Podloge za određivanje, čuvanje i uzgoj bakterija

- HA (hranjivi agar) sastava: pepton 15 g/l; mesni ekstrakt 3 g/l; natrijev klorid 5 g/l; trikalijev fosfat 0,3 g/l; agar 18 g/l otopljeni u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven u Petrijeve zdjelice.
- HB (hranjivi bujon) - istog sastava kao i hranjivi agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.

Podloge za određivanje, čuvanje i uzgoj kvasaca i plijesni

- SA (sladni agar) sastava: sladni ekstrakt 30 g/l; agar 17 g/l. pH vrijednost podloge je 5.5±0.1; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/15 min.

- SB (sladni bujon) je istog sastava kao sladni agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.
- DG-18 (dikloran 18 % glicerolni agar) sastava: glukoza 10 g/l; pepton 5 g/l; monokalijev fosfat 1 g/l; magnezijev sulfat heptahidrat 0,5 g/l; agar 15 g/l; glicerol 220 g/l; dikloran 0.002 g/l i kloramfenikol 0,1 g/l otopljeni u destiliranoj vodi; pH podloge je 5.6. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121 °C, 15 min). Sadržaj je dobro promiješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

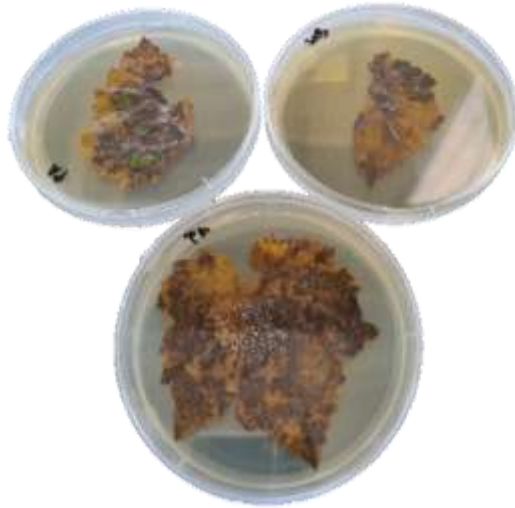
3.1.3. Pribor i oprema

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- vibracijska miješalica (Tehnica, Slovenija)
- inkubator MEMMERT BE 600 (Mettler GmbH + Co.KG, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Njemačka)
- mikroskop (Olympus, Japan)
- denzimat (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska)
- mikrobiološke epruvete (16×160 mm)
- mikrobiološka ušica
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)

3.2. Metode

3.2.1. Izolacije mikroorganizama na hranjivim podlogama

Kako bi se provela izolacija mikroorganizama prisutnih na zaraženim listovima vinove loze, listovi su stavljani na podloge na način da je plojka lista položena cijelom površinom na hranjivu podlogu (slika 3). Inkubacija je provedena na sobnoj temperaturi od 25 °C tijekom 7 dana. Ploče s hranjivom podlogom su označene slovima kako bi se dobio slijed u izolaciji pojedine kulture.



Slika 3. Listovi vinove loze na hranjivim podlogama (vlastita fotografija)

3.2.2. Izolacija čiste kulture poraslih kolonija

Nakon inkubacije, porasle kolonije su precijepljene na nove hranjive podloge kako bi se izolirale čiste kulture pojedinih mikroorganizama. Za izolaciju su izabrane kolonije različitih boja i oblika kako bi se identificiralo što više poraslih mikroorganizama. Podloge su inkubirane na 37 °C tijekom 24-48 h za bakterije te na 28 °C tijekom 24-48 h za kvasce i plijesni. Ovaj postupak je ponavljan sve dok na podlogama nisu bile pojedinačne čiste kulture jednog mikroorganizma.

3.2.3. Jednostavno bojanje

Nakon odmaščivanja provlačenjem kroz plamen, na predmetnicu je nanešen uzorak u tankom sloju i ostavljen na sušenju. Nakon sušenja preparat je provučen kroz plamen s ciljem fiksiranja te je zatim na ohlađenu predmetnicu nanešeno bojilo metilensko modrilo koje odstoji 5 min. Nakon proteklog vremena višak boje je ispran mlazom vodovodne vode, a višak tekućine pokupljen staničevinom. Na preparat je stavljena kapljica imerzijskog ulja, a mikroskopiranje je provedeno pomoću imerzijskog objektiva pri povećanju 1000×.

3.2.4. Bojanje po Gramu

Prvi korak bojanja po Gramu uključio je odmaščivanje predmetnice s ciljem uklanjanja tragova deterdženta provlačenjem tri puta kroz plamen. Na ohlađenu predmetnicu nanešena je bakterijska kulutra u tankom sloju. Osušeni preparat je fiksiran provlačenjem kroz plamen s donje strane preparata, te je na ohlađenu predmetnicu nanešeno prvo bojilo-kristal violet. Nakon 1 minute na postojeću boju je dodana lugolova otopina te je nakon jedne minute sva boja isprana s preparata. Prvi korak je uključivao lagano ispiranje s 96 % etanolom kako bi se

uklonio višak nevezane boje a drugi korak ispiranje pod laganim mlazom vodovodne vode. Na vlažni preparat je nanešeno kontrastno bojilo-safranin koje stoji na preparatu 3-5 min. Nakon proteklog vremena boja je isprana s preparata pod mlazom vodovodne vode, a višak tekućine pokupljen staničevinom. Na tako pripremljeni preparat je stavljena kap imerzijskog ulja, a mikroskopiranje je provedeno na imerzijskom objektivu pri povećanju 1000 \times .

3.2.5. API 50 CHL biokemijski test

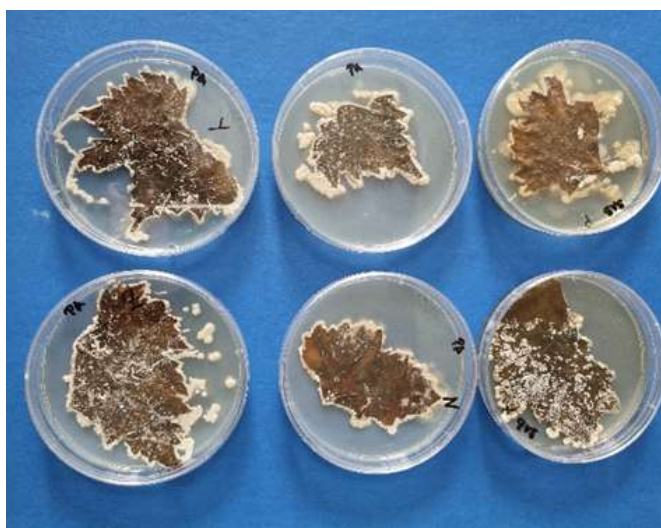
Ispitivana bakterijska kultura uzgojena je na MRS agaru u obliku kolonija anaerobno kroz 24 sata pri 37 °C. Pomoću mikrobiološke ušice se u kivetu koja sadrži API 50 CHL medij, dodalo nekoliko identičnih kolonija s MRS agara. Gustoća inokuluma mjerena je u denzimat, a mora iznositi 2 McF. Pripremljena suspenzija se nakapala u jažice API 50 CH V5.1 stripa koji sadrži 49 različitih ugljikohidrata. U sve jažice nakapalo se i mineralno ulje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti, te je provedena inkubacija pri 37 °C kroz 48 sati, nakon čega su očitani rezultati. Pozitivni testovi su oni, kod kojih je došlo do promjene boje u žuto, uslijed acidifikacije i prisutnosti bromkrezol purpurnog indikatora. Biokemijski profil je identificiran pomoću programa na računalu koji sadrži bazu podataka (V 5.1). Razina pouzdanosti izražena je kao izvrsna ($\geq 99.9\%$), veoma dobra ($\geq 99.0\%$), dobra ($\geq 90.0\%$), prihvatljiva ($\geq 80\%$) ili neprihvatljiva identifikacija ($< 80\%$).

3.2.6. API 20 C AUX biokemijski test

Ispitivana kvaščeva kultura uzgojena je na sladnom agaru u obliku kolonija aerobno kroz 24 sata pri 28 °C. Pomoću mikrobiološke ušice se, u kivetu koja sadrži API suspenzijski medij, dodalo nekoliko identičnih kolonija sa sladnog agara. Gustoća inokuluma mjerena je u denzimat, a mora iznositi 2 McF. 100 μ l tako pripremljene suspenzije odpipetirano je u API C medij koji se zatim nakapao u jažice API 20 C AUX stripa koji sadrži 19 različitih ugljikohidrata. Inkubacija je provedena pri 28 °C kroz 48-72 sata, nakon čega su očitani rezultati. Pozitivni testovi su oni, kod kojih je došlo do zamućenja jažice. Biokemijski profil je identificiran pomoću programa na računalu koji sadrži bazu podataka (V 5.1). Razina pouzdanosti izražena je kao izvrsna ($\geq 99,9\%$), veoma dobra ($\geq 99,0\%$), dobra ($\geq 90,0\%$), prihvatljiva ($\geq 80\%$) ili neprihvatljiva identifikacija ($< 80\%$).

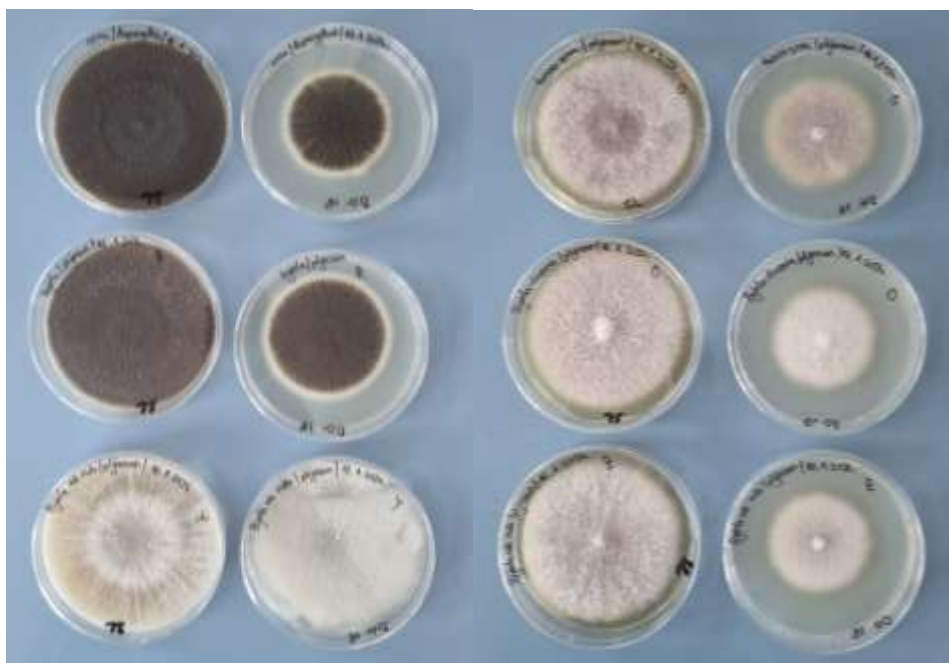
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovoga rada bio je izolirati i identificirati različite kulture mikroorganizama s listova vinove loze zaražene peronosporom. Listovi su stavljeni na hranjive podloge te je nakon inkubacije došlo do porasta različitih kultura mikroorganizama (slika 4). Prema različitom morfološkom izgledu pojedinih kolonija, odabrane su naizgled različite kolonije koje su zatim precijepljene na nove hranjive podloge s ciljem izolacije čiste kulture jednog mikroorganizma. Kako bi se dobile čiste kulture bilo je potrebno precijepljivanje na nove hranjive podloge nekoliko puta.



Slika 4. Porasle kolonije na hranjivim podlogama (vlastita fotografija)

Iz dobivenih čistih kultura vizualno su izdvojene podloge na kojima su porasle plijesni (slika 5). Plijesni su nacijepljene na dvije različite hranjive podloge, sladni agar i dikloran glicerol agar jer pojedine plijesni različito rastu i izgledaju (npr. razlika u bojama) ovisno o sastavu hranjive podloge. Također, na ovaj način je s većom sigurnošću utvrđeno kojim rodovima ove plijesni pripadaju budući da je identifikacija provedena samo vizualnom usporedbom bez dodatnih metoda identifikacije poput PCR metode. Za usporedbu rezultata korišten je laboratorijski priručnik Instituta za fungalnu bioraznolikost Weserdijk, Utreht, Nizozemska. Plijesni su identificirane prema poznatim morfološkim obilježjima pojedinih plijesni i to usporedbom izgleda kolonija na hranjivim podlogama te izgleda konidiofora i spora pod mikroskopom s njihovim već poznatim izgledom.

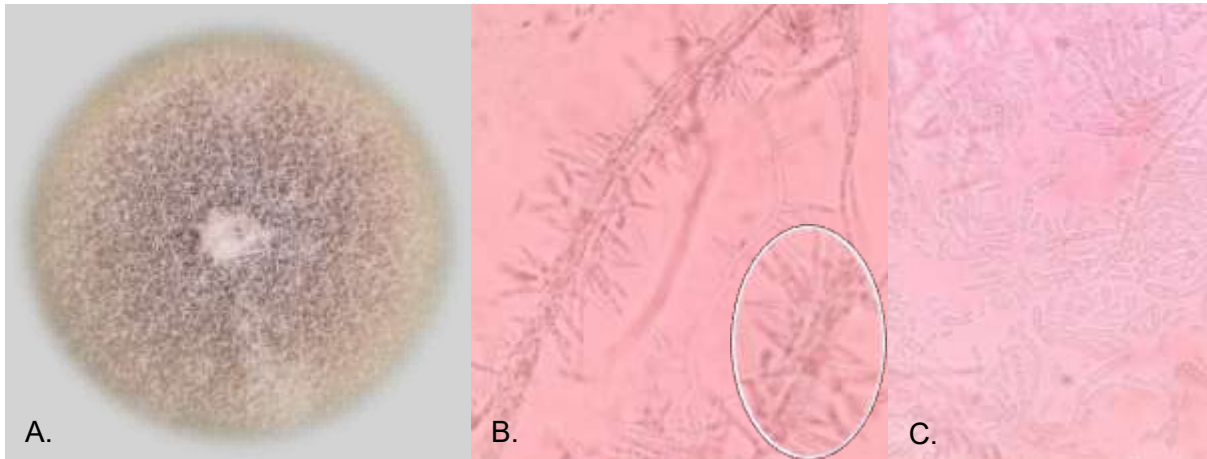


Slika 5. Čiste kulture plijesni na sladnom i dikloran glicerol agaru (vlastita fotografija)

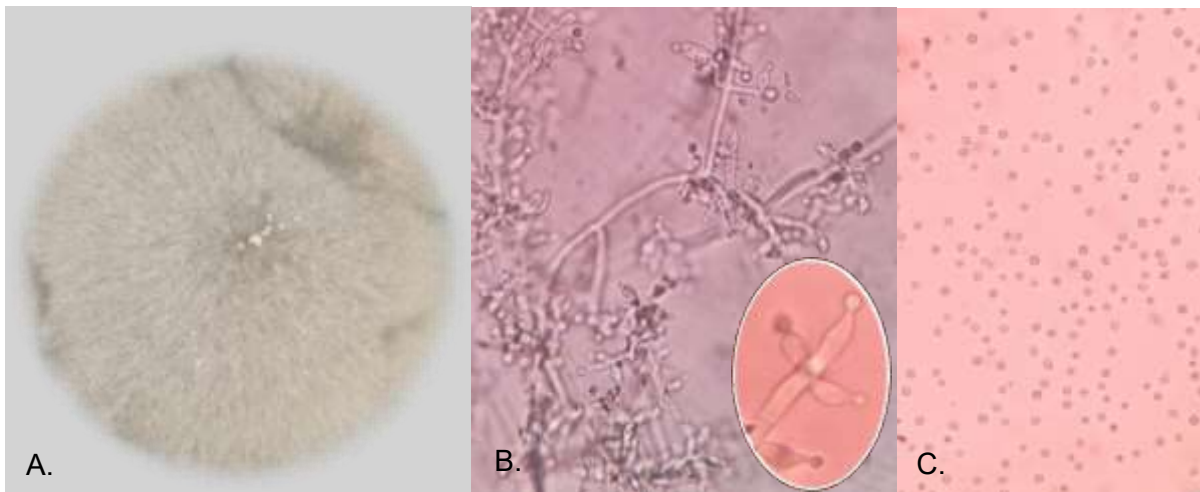
Izolirane kulture plijesni uključivale su šest čistih kultura, no nakon identifikacije utvrđeno je se pojedini rezultati ponavljaju. Tri puta je izoliran *Fusarium* sp., dva puta *Aspergillus* sp., dok je *Trichoderma* sp. izolirana jednom, pa su sveukupno izolirane tri različite vrste plijesni (slike 6-8).



Slika 6. *Aspergillus* sp. A. Kolonija nakon 7 dana pri 25 °C na DG-18. B. Konidiofor C. Spore (vlastita fotografija)



Slika 7. *Fusarium* sp. A. Kolonija nakon 7 dana pri 25 °C na DG-18. B. Konidiofor C. Spore (vlastita fotografija)



Slika 8. *Trichoderma* sp. A. Kolonija nakon 7 dana pri 25 °C na DG-18. B. Konidiofor C. Spore (vlastita fotografija)

Navedeni rezultati su slični ranije provedenim istraživanjima u kojima su Abdullah i sur. (2015) iz vinove loze koja je pokazala simptome različitih bolesti poput truleži drveta, oslabljenog rasta, crnih i žutih mrlja, izolirali plijesni iz izbojaka i korijena. U istraživanju su naveli da su iz izbojaka bolesne vinove loze najčešće bile izolirane plijesni *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporoides*, *Clonostachys rosea* i *Neocyttalidium dimidiatum*, a iz korijena bolesne vinove loze *Fusarium* spp., *Acremonium* spp. i *Phaeoacremonium* sp.2.

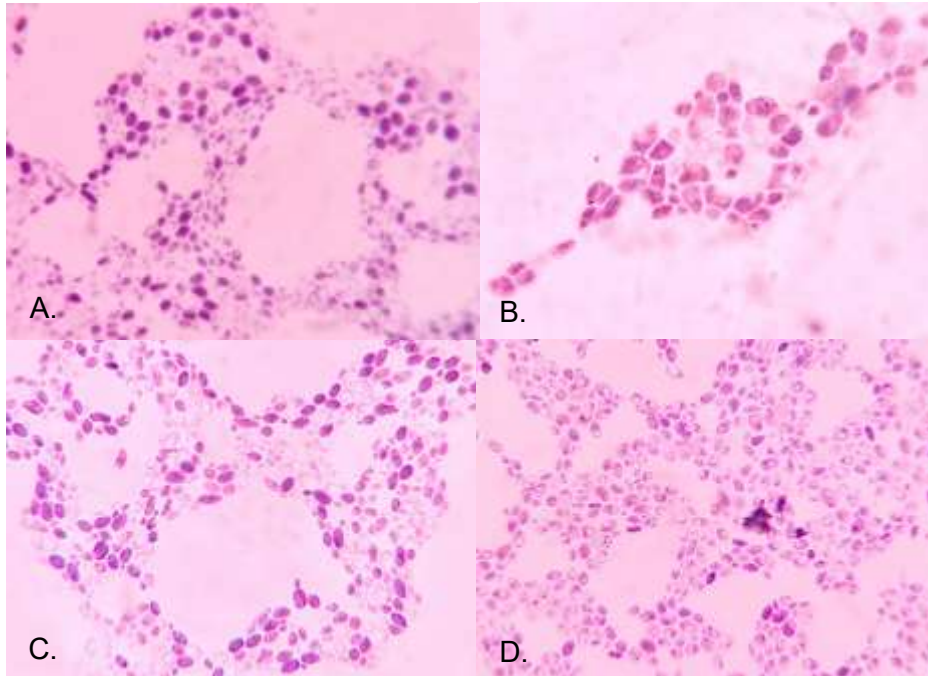
Billar de Almeida i sur. (2020) proveli su istraživanje u kojemu su iz nekoliko uzoraka zdrave vinove loze i vinove loze zaražene bolestima debela izolirali različite vrste plijesni iz korijena, peteljki i listića. Među najzastupljenijima i kod zdravih i kod zaraženih uzoraka bile su plijesni *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. i *Trichoderma* sp.. Plijesni *Fusarium* sp. i *F. oxysporum* bile su u puno većem broju prisutne na zaraženim uzorcima, dok

je populacija plijesni rodova *Penicillium* i *Trichoderma* bila značajno manja na zaraženim uzorcima, a populacija *A. niger* tek nešto manja u usporedbi s njihovom brojnosti na zdravim uzorcima vinove loze. Dobiveni rezultati slični su rezultatima dobivenim u ovom radu, no ne može se utvrditi da je prisutnost izoliranih plijesni (*Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp.) povezana isključivo s bolešću, već one čine uobičajenu mikrofloru vinove loze, a moguće je da bolest utječe na njihovu brojnost na način da se populacija određene plijesni zbog bolesti poveća ili smanji kao što u svom istraživanju navode Billar de Almeida i sur. (2020).

Za ostale podloge s mikroorganizmima bilo je potrebno provesti jednostavno bojanje i mikroskopiranje kultura kako bi se utvrdilo na kojima su bakterije, a na kojima kvasci. Čistoća izoliranih kvašćevih kultura (slika 9) provjerena je jednostavnim bojanjem (slika 10), a identifikacija je provedena pomoću API biokemijskog testa (tablica 2).



Slika 9. Izolirane čiste kulture kvasaca na sladnom agaru (vlastita fotografija)



Slika 10. Mikroskopske slike preparata kvasaca dobivene jednostavnim bojanjem (povećanje 1000×) A. *Candida spherica* B. *Kloeckera* spp. C. *Candida pelliculosa* D. *Candida famata* (vlastita fotografija)

Dobiveni rezultati pokazali su visoku razinu pouzdanosti ($\geq 99\%$), pa se mogu smatrati točnima bez potrebe za provođenjem drugih metoda identifikacije koje bi potvrdile rezultate API testa. Identificirane su vrste *Candida spherica*, *Kloeckera* spp., *Candida pelliculosa* i *Candida famata* što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima u kojima su često izolirani kvasci rodova *Candida* i *Kloeckera* s lišća i bobica vinove loze (Lira i sur., 2023; Kačániová i sur., 2018).

Slični rezultati zabilježeni su u istraživanju Kántor i Kačániová (2015) koji su s površine bobica grožđa izolirali različite vrste kvasaca iz roda *Candida* poput *Candida valida*, *Candida utilis* i *Candida krusei*, ali i kvasce iz roda *Kloeckera* poput vrste *Kloeckera apiculata*. Obzirom na navedeno, može se zaključiti da su izolirani rodovi kvasaca dio uobičajene mikroflore vinove loze. Do danas nisu provedena istraživanja koja bi potvrdila koji su kvasci specifično prisutni na površini vinove loze zaražene s *P. viticola*, ali u istraživanju kojega su proveli Nityagovsky i sur. (2024) utvrđeno je da je na zaraženim uzorcima vinove loze manja zastupljenost *Kabatina* sp., *Aureobasidium* sp. i *Vishniacozyma* sp. nego što je njihova zastupljenost na zdravih uzorcima vinove loze.

Nadalje, bitno je istaknuti da su izolirane čiste kulture kvasaca na slalom agaru uključivale pet čistih kultura, no nakon provedene identifikacije pomoću API testa uočen je duplikat to jest dva puta je izolirana *C. pelliculosa*. Zbog navedenog, u konačnim rezultatima prikazanim u tablici 2 ukupno je 4 vrste kvasaca.

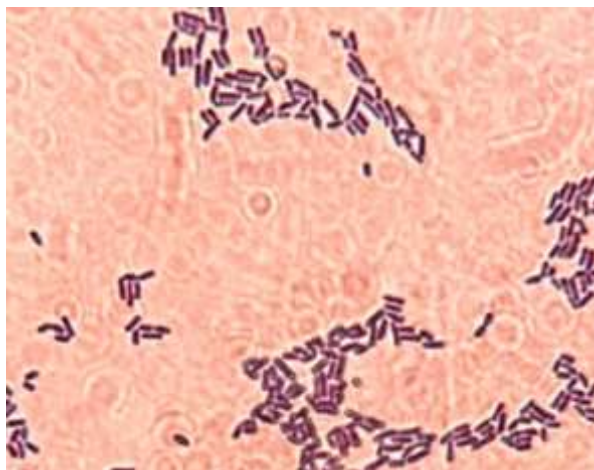
Tablica 2. Čiste kulture kvasaca identificirane API biokemijskim testom

Uzorci	Rezultati	Razina pouzdanosti
Bijela kolonija s lista, X	<i>Candida spherica</i>	99,5 %
Bijela kolonija uz rub lista, M	<i>Kloeckera</i> spp.	99,3 %
Bijela kolonija uz rub lista, X	<i>Candida pelliculosa</i>	99 %
Krem kolonija uz rub lista, X	<i>Candida famata</i>	99,7 %

Kako bi se provjerila čistoća potencijalnih izolata BMK (slika 11) isti su obojani po Gramu (slika 12), a identifikacija pomoću API biokemijskog testa pokazala je da se radi o vrsti *Lactobacillus plantarum* (99,9 %). Rezultati API testa su također pokazali da su sva tri uzorka ista tj. da je uspješno izolirana samo jedna vrsta BMK.



Slika 11. Čiste kulture bakterija mliječne kiseline (vlastita fotografija)



Slika 12. Bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* obojana po Gramu (povećanje 1000×) (vlastita fotografija)

Prema ranijim istraživanjima koja su proveli Franco i sur. (2021) može se zaključiti da BMK roda *Lactobacillus* čine uobičajenu mikrofloru zdrave vinove loze. Navedeni autori su istraživali utjecaj alkoholne fermentacije na raznolikost BMK, pa su iz mošta zdravoga grožđa izolirali nekoliko rodova BMK, a dominantan rod bio je *Leuconostoc*, zatim *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* i *Weisella*. Nakon 7 dana uočen je negativan utjecaj na brojnost BMK tako što je značajno smanjena populacija bakterija *Lactobacillus* i *Pediococcus*. Prema Bartowsky (2017) očekivano je da se broj BMK smanji kako alkoholna fermentacija napreduje jer je u okolini prisutna veća koncentracija etanola i manja koncentracija šećera, a na površini grožđa često su prisutni upravo rodovi *Lactobacillus* i *Pediococcus* koji onda sudjeluju u početku alkoholne fermentacije te se s vremenom njihova populacija smanjuje. Kačániová i sur. (2018) također su izolirali s površine bobica zdrave vinove loze različite gram pozitivne bakterije poput bakterija iz rodova *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* i *Lactobacillus*. Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo koje su bakterije češće prisutne na vinovoj lozi zaraženoj peronosporom, no u jednom od istraživanja kojeg su proveli Nityagovsky i sur. (2024) utvrđeno je da su kod uzoraka vinove loze zaražene s *P. viticola* u manjem broju prisutne bakterije *Hymenobacter* spp., *Sphingomonas* spp., *Massilia* spp. i *Chryseobacterium* spp., u odnosu na uzorke zdrave vinove loze. Može se pretpostaviti da zaraza vinove loze s *P. viticola* općenito smanjuje broj drugih mikroorganizama uobičajeno prisutnih na površini zdrave vinove loze.

5. ZAKLJUČCI

1. S listova vinove loze zaražene s *P. viticola* uspješno su izolirane i identificirane čiste kulture nekoliko skupina mikroorganizama koji pripadaju bakterijama, kvascima i plijesnima.
2. *Lactobacillus plantarum* izoliran je kao jedina bakterijska vrsta, a pripada skupini bakterija mliječne kiseline.
3. Izolirana su četiri soja kvasca koji pripadaju rodovima *Candida* i *Kloeckera*.
4. Sa zaraženih listova vinove loze izolirane su plijesni *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. i *Trichoderma* sp., a potrebno je provesti dodatne testove identifikacije kako bi se utvrdila točna vrsta.
5. Nije utvrđena specifičnost prisutne mikroflore na listovima vinove loze zaraženim peronosporom u odnosu na već ranije poznatu mikrofloru zdrave vinove loze. Potrebno je provesti detaljnija istraživanja kako bi se utvrdilo postoje li određene vrste mikroorganizama koje su specifično prisutne na vinovoj lozi zaraženoj peronosporom, te utječe li bolest vinove loze na brojnost prisutne mikroflore.

6. POPIS LITERATURE

Abdullah SK, Al-Samarraie MQ, Al-Assie AH (2015) Fungi associated with grapevine (*Vitis vinifera* L) decline in middle of Iraq. *Egypt Acad J Biolog Sci* **7**, 53-59.

<https://doi.org/10.21608/eajbsg.2015.16485>

Ahmed MFA (2018) Evaluation of some biocontrol agents to control Thompson seedless grapevine powdery mildew disease. *Egypt J Biol Pest Control* **28**, 93.

<https://doi.org/10.1186/s41938-018-0098-0>

Bartowsky E (2017) Microbiology of winemaking. *Microbiol Aust* **38**, 76-79.

<https://doi.org/10.1071/MA17033>

Billar de Almeida A, Concas J, Campos MD, Materatski P, Varanda C, Patanita M, i sur. (2020) Endophytic fungi as potential biological control agents against grapevine trunk diseases in Alentejo region. *Biology* **9**, 420. <https://doi.org/10.3390/biology9120420>

Clippinger JI, Dobry EP, Laffan I, Zorbas N, Hed B, Campbell MA (2024) Traditional and emerging approaches for disease management of *Plasmopara viticola*, causal agent of downy mildew of grape. *Agriculture* **14**, 406. <https://doi.org/10.3390/agriculture14030406>

Estreicher SK (2017) The beginning of wine and viticulture. *Phys Status Solidi* **14**, 1700008.

<https://doi.org/10.1002/pssc.201700008>

Fischer M (2022) *Pseudopezicula tracheiphila* (Rotbrenner).

<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.45251> Pristupljeno 2. travnja 2024.

Franco W, Benavides S, Valencia P, Ramírez C, Urtubia A (2021) Native yeasts and lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of seven grape cultivars from the Maule region (Chile). *Foods* **10**, 1737. <https://doi.org/10.3390/foods10081737>

Fugelsang KC, Edwards CG (2007) Wine Microbiology, 2.izd., Springer, New York, str. 85-91.

Gonzalez-Dominguez E, Caffi T, Paolini A, Mugnai L, Latinović N, Latinović J, i sur. (2022) Development and validation of a mechanistic model that predicts infection by *Diaporthe ampelina*, the causal agent of phomopsis cane and leaf spot of grapevines. *Front Plant Sci* **13**, 872333. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.872333>

Görür V, Akgül DS (2019) Fungicide suspensions combined with hot-water treatments affect endogenous *Neofusicoccum parvum* infections and endophytic fungi in dormant grape-vine canes. *Phytopathol Mediterr* **58**, 559-571. <https://doi.org/10.14601/Phyto-10822>

Grba S (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, 1.izd., Plejada d.o.o., Zagreb, str. 156.

Hornsey I (2007) The Chemistry and Biology of Winemaking, 1 izd., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, str. 367-368.

Ivić D (2014) Agrotehničke, mehaničke i fizikalne mjere u zaštiti bilja od bolesti. *Glasilo biljne zaštite* **14**, 391-399.

Jayawardena RS, Zhang W, Li XH, Liu M, Hao YY, Zhao WS, i sur. (2018) Characterization of *Botrytis cinerea* causing grape bunch rot in Chinese vineyards. *Asian J Microbiol* **1**, 74–87. [doi:10.5943/ajom/1/1/6](https://doi.org/10.5943/ajom/1/1/6)

Kačániová M, Terentjeva M, Felsöciová S, Ivanišová E, Kunová S, Žiarovská J, i sur. (2018) Bacteria and yeasts isolated from different grape varieties. *Potr S J F Sci* **12**, 108–115. <https://doi.org/10.5219/878>

Kántor A, Kačániová M (2015) Diversity of bacteria and yeasts on the surface of table grapes. *J Anim Sci Biotechnol* **48**, 1.

Karoglan Kontić J, Omazić B, Telišman Prtenjak M, Karoglan M, Preiner D (2023) Vodič za prilagodbu vinogradarske proizvodnje klimatskim uvjetima, 1. izd., Grafika d.o.o., Osijek, str. 7-8.

Koledenkova K, Esmael Q, Jacquard C, Nowak J, Clément C, Ait Barka E (2022) *Plasmopara viticola* the causal agent of downy mildew of grapevine: from its taxonomy to disease management. *Front Microbiol* **13**, 889472. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.889472>

König H, Uden G, Fröhlich J (2017) Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine, 2.izd., Springer, Cham, Switzerland, str. 117.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5>

Krieger-Weber S, Heras JM, Suarez C (2020) *Lactobacillus plantarum*, a new biological tool to control malolactic fermentation: a review and an outlook. *Beverages* **6**, 23.

<https://doi.org/10.3390/beverages6020023>

Kuzmanovska B, Rusevski R, Bandzo Oreshkovikj K, Jankulovska M (2023) *Bacillus* spp. – a potent biological control agents against downy mildew of grapevine. *J Agric Food Environ Sci* **77**, 26-32.

Lira NdA, Goulart NMV, Passamani FRF, Evangelista SR, Santos MAdA, Batista LR (2023) Microbial diversity of syrah grapes cultivated for winter wine production in minas gerais, Brazil. *Ciênc Agrotec* **47**.

<https://doi.org/10.1590/1413-7054202347008823>

Maceljiski M, Cvjetković B, Ostojčić Z, Barić B (2006) Štetočine vinove loze, 1.izd., ZRINSKI d.d., Čakovec, str. 17-18., 149.-151., 190-192.

Maicas S (2020) The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms* **8**, 1142.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

Maletić E, Karoglan Kontić J, Pejić I, Preiner D, Zdunić G, Bubola M, i sur. (2018) Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze, 1. izd., Stega tisak, Zagreb, str. 4-11.

Malviya A (2020) Recent advances in chemistry and its impact on society: some common fungicides, bactericides and their role in plant disease control, 1.izd., Q-2A Hauz Khas Enclave, New Delhi, str. 197-201.

Miličević T (2020) Biofungicidi i mogućnosti njihove primjene u suzbijanju fitopatogenih gljiva i pseudogljiva. *Glasnik Zaštite Bilja* **43**, 72-75. <https://doi.org/10.31727/gzb.43.4.9>

Naher L, Yusuf UK, Ismail A, Hossain K (2014) *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. *Pak J Bot* **46**, 1489-1493.

Negri S, Lovato A, Boscaini F, Salvetti E, Torriani S, Commisso M, i sur. (2017) The induction of noble rot (*Botrytis cinerea*) infection during postharvest withering changes the metabolome of grapevine berries (*Vitis vinifera* L., cv. Garganega). *Front Plant Sci* **8**, 1002.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01002>

Nityagovsky NN, Ananov AA, Suprun AR, Ogneva ZV, Dneprovskaya AA, Tyunin AP, i sur (2024) Distribution of *Plasmopara viticola* causing downy mildew in Russian far east grapevines. *Horticulturae* **10**, 326. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10040326>

Pérez-Roncal C, López-Maestresalas A, Lopez-Molina C, Jarén C, Urrestaraz J, Santesteban LG, i sur. (2020) Hyperspectral imaging to assess the presence of powdery mildew (*Erysiphe necator*) in cv. Carignan Noir grapevine bunches. *Agronomy* **10**, 88.

<https://doi.org/10.3390/agronomy10010088>

Pinto C, Gomes AC (2016) *Vitis vinifera* microbiome: from basic research to technological development. *BioControl* **61**, 243–256. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9725-4>

Pinto C, Pinho D, Cardoso R, Custódio V, Fernandes J, Sousa S, i sur. (2015) Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Front Microbiol* **6**, 905. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00905>

Ruano-Rosa D, Sánchez-Hernández E, Baquero-Foz R, Martín-Ramos P, Martín-Gil J, Torres-Sánchez S, i sur. (2022) Chitosan-based bioactive formulations for the control of powdery mildew in viticulture. *Agronomy* **12**, 495. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020495>

Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B (2019) Food and Indoor Fungi, 2.izd., Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht.

Taylor A (2021) Downy mildew of grapevines - Agriculture and Food.

<https://agric.wa.gov.au/n/2475>. Pristupljeno 2. travnja 2024.

Tufariello M, Fragasso M, Pico J, Panighel A, Castellarin SD, Flamini R, i sur. (2021) Influence of non-*Saccharomyces* on wine chemistry: a focus on aroma-related compounds. *Molecules* **26**, 644. <https://doi.org/10.3390/molecules26030644>

Izjava o izvornosti

Ja Ana Cvitanović izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis