

# Utjecaj antioksidansa u predkulturi mikroreznica in vitro na regeneraciju vinove loze nakon krioprezervacije

---

**Marković, Zvezdana; Tomšić, Barbara; Bošnjak Mihovilović, Anita; Ivana Tomaz, Ivana; Preiner, Darko; Anđelić, Tatjana; Leposavić, Aleksandar; Paunović, Svetlana; Vujović, Tatjana**

*Source / Izvornik:* **Zbornik radova 57. hrvatskog i 17. međunarodnog simpozija agronoma, 2022, 575 - 580**

**Conference paper / Rad u zborniku**

*Publication status / Verzija rada:* **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:817694>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-31**



*Repository / Repozitorij:*

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



## Utjecaj antioksidansa u predkulturi mikroreznica *in vitro* na regeneraciju vinove loze nakon krioprezervacije

Zvezdana Marković<sup>1</sup>, Barbara Tomšić<sup>1</sup>, Anita Bošnjak Mihovilović<sup>1</sup>, Ivana Tomaz<sup>1</sup>, Darko Preiner<sup>1</sup>, Tatjana Anđelić<sup>2</sup>, Aleksandar Leposavić<sup>2</sup>, Svetlana Paunović<sup>2</sup>, Tatjana Vujović<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Svetošimunska cesta 25, Zagreb, Hrvatska (zmarkovic@agr.hr)

<sup>2</sup>Institut za voćarstvo, Kralja Petra I No. 9, Čačak, Srbija

### Sažetak

Protokole krioprezervacije potrebno je testirati za autohtone sorte na zaraženom i zdravom sadnom materijalu, jer zaraženost može predstavljati problem u kulturi tkiva. Antioksidansi mogu potaknuti rast biljaka. Cilj rada bio je uspostaviti regeneraciju biljaka inficiranih genotipova u *in vitro* uvjetima, te na njima testirati standardni protokol krioprezervacije za vinovu lozu. Pupovi inficiranih genotipova veličine 1,5 mm postavljeni su na različite MS (Murashige i Skoog) medije uz dodatak 0,5 mg L<sup>-1</sup> 6-benzilaminopurina (BAP) i 0,05 mg L<sup>-1</sup> indol-3-octene kiseline (IAA) sa antioksidansima (M1: 0,1 mM salicilne kiseline, M2: 1 mM askorbinske kiseline, M3: 1 mM glutationa i M4: kombinacija tri antioksidansa navedenih koncentracija), te je praćen njihov rast *in vitro*. Iz potjeralih biljaka izolirani su vršni meristemi, te je proveden pokus krioprezervacije (LS-20', ½ PVS2-30' i PVS2-50' kontrola i smrzavanje). Najveći rast *in vitro* postignut je na mediju sa dodatkom glutationa (M3). Zaraženost je imala utjecaj u regeneraciji biljaka *in vitro*, ali nije utjecala na regeneraciju nakon krioprezervacije.

**Ključne riječi:** rast *in vitro*, inficirani genotipovi, antioksidansi, regeneracija, krioprezervacija

### Uvod

Vinova loza je najrasprostranjenija voćna vrsta u svijetu, koja svojom ukupnom proizvodnjom dominira nad ostalim kulturama (Maletić i sur., 2008). 'Plavac mali crni' je autohtona sorta srednje i južne Dalmacije (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Po zastupljenosti u sortimentu Republike Hrvatske je na trećem mjestu, iza Graševine i Malvazije istarske. Kakvoća najviše ovisi o položaju, a za uzgoj ove sorte ističu se položaji Dingač, Postup, Sv. Nedjelja, Ivan Dolac (Maletić i sur., 2015). 'Pošip bijeli' je autohtona sorta otoka Korčule (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Na otoku Korčuli, Čarskom i Smokvičkom polju ima najviše 'Pošipa bijelog', a nalazi se i na susjednim otocima te priobalju. Danas je jedna od najpoznatijih bijelih sorata Dalmacije (Maletić i sur., 2015). Brzo klonsko razmnožavanje u *in vitro* uvjetima, odličan je način dobivanja velike količine biljnog materijala bez patogena. Virusom inficirani biljni materijal, slabije reagira na uvjete kulture tkiva. Uz brzo klonsko razmnožavanje, moguće je u *in vitro* uvjetima smrznuti biljni materijal, te ga na taj način pohraniti na duži vremenski period. Nova metoda bazirana je na pohrani biljnog materijala u tekućem dušiku (liquid nitrogen, LN) pri niskim temperaturama (-196 °C) koje uvjetuju potpuno zaustavljanje metaboličkih funkcija biološkog materijala, te na taj način omogućuju čuvanje uzoraka na duži period (Reed, 2008). Postoji nekoliko protokola za krioprezervaciju vinove loze, ali ne postoji standardni protokol koji je učinkovit u svakom istraživačkom laboratoriju za veći broj sorata vinove loze. Sorte vinove loze različito reagiraju na krioprezervaciju te je potrebno prvo ispitati

protokol kako bi se postigla visoka stopa regeneracije. Antioksidans je svaka tvar koja odgađa ili sprječava oksidaciju spojeva koji su podložni oksidaciji, poput lipida, proteina, deoksiribonukleinske kiseline (DNK) i ugljikohidrata. Funkcija antioksidansa u biološkim sustavima je onemogućavanje djelovanja slobodnih radikala (Halliwell i sur., 1995). Cilj ovog rada je pokazati kako virusima inficirani genotipovi rastu u *in vitro* uvjetima, te kako reagiraju na osnovni standardni protokol krioprezervacije.

### Materijal i metode

Odabrane su dvije autohtone sorte 'Plavac mali crni' i 'Pošip bijeli'. Biljni materijal sorata 'Plavac mali crni' i 'Pošip bijeli' za unos u *in vitro* kulturu je dobiven prikupljanjem virusom zaraženih i zdravih reznica iz vinograda sa pokušališta Jazbina. Potjerali izdanci, sterilizirani su po standardnom protokolu (ispiranje tekućom vodom, potapljanje u 70 % etanolu 20 minuta, izlaganje 5 % otopini natrijevog hipoklorita 15 minuta, te tri puta ispiranje sterilnom vodom u laminaru) te su korišteni za postavljanje pokusa u predkulturi mikroreznica. Za postavljanje na hranjivi medij korišteni su nodijski odsječci veličine 1,5 cm sa jednim pupom tzv. mikroreznice. Nakon postavljanja na medije, mikroreznice su rasle u uvjetima klima komore (Aralab Fitoklima PL 1200) na konstantnih  $26 \pm 0,5$  °C pod bijelim LED svjetlom u intenzitetu od  $100 \mu\text{mol cm}^{-2}$  uz fotoperiod od 16 sati svjetla i 8 sati mraka. U ovom istraživanju je korišten hranjivi medij laboratorijske oznake B inicijalni medij sastava MS (Murashige i Skoog, 1962.) medij uz dodatak biljnih hormona citokinina 6-benzilaminopurin (BAP) u koncentraciji od  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  i auksina indol-3-octena kiseline (IAA) u koncentraciji od  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $30 \text{ g L}^{-1}$  saharoze,  $8 \text{ g L}^{-1}$  agara i pH podešen na 5,8 prije autoklaviranja. U B inicijalni medij za postavljanje pokusa su dodani antioksidansi u koncentracijama kako je navedeno u tablici 1. Nakon provedene krioprezervacije eksplantati su postavljeni u Petrijeve zdjelice (90 mm) po 15 eksplantata na regeneracijski medij (RM) i na osnovu toga je napravljena statistička obrada podataka.

Tablica 1. Prikaz oznaka medija i naziva medija sa koncentracijama antioksidansa korištenih u istraživanju

Oznaka medija	Naziv medija i koncentracija antioksidansa
M_1	B inicijalni + 0.1 mM salicilna kiselina (SA)
M_2	B inicijalni + 1 mM askorbinska kiselina (AA)
M_3	B inicijalni + 1 mM glutation (GSH)
M_4	B inicijalni + 0.1mM SA+1mM AA+1mM GSH
RM	MS medij + $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ BAP-a

Korištene su 2 sorte, odnosno njihovi klonovi ('Plavac mali' (PMC) i 'Pošip bijeli' (POŠ)), te su uzorci uzimani sa nekoliko trseva (PMC sa 6 trseva, a POŠ sa 2 trsa). U testiranju predkulture mikroreznica, svaki pojedini trs je promatran pojedinačno, dok se u testiranju protokola krioprezervacije zanemarilo podrijetlo materijala i uzorci su testirani na razini sorte. Nakon uzimanja materijala provedeno je testiranje na viruse. Sanitarni status korištenih klonova tj.trseva je prikazan u tablici 2. Prisustvo virusa GFLV, GFLaV-1 i GFLaV-3 je utvrđeno ELISA testom. Mikroreznice su postavljene na medije sa antioksidansima (salicilna kiselina, askorbinska kiselina i glutation, te njihova kombinacija). Na jedan medij je postavljeno 10-12 mikroreznica sa svakog pojedinog trsa, kada je bilo dovoljno potjeralog materijala. U slučaju ograničene količine potjeralog materijala, prvo su postavljane mikroreznice na medije M\_1 i M\_4 (sa salicilnom kiselinom i kombinacijom antioksidansa) pa na medij M\_2 i na kraju na medij M\_3.

Tablica 2. Prikaz klona i broja trsa sorata 'Plavac mali' i 'Pošip bijeli', korištenih u istraživanju i njihov sanitarni status

Sorta	Klon i broj trsa	Sanitarni status
'Plavac mali crni'	PMC16-12	bez virusa
	PMC16-3	(LR3)
	PMC16-8	(GFLV+LR1)
	PMC16-18	(LR1)
	PMC19-13	bez virusa
	PMC19-15	(GFLV)
'Pošip bijeli'	POŠ089-3	bez virusa
	POŠ089-11	(LR1+LR3)

Nakon sadnje na medij sa antioksidansima, a u svrhu dobivanja materijala za pokuse krioprezervacije, pratili su se rast i razvoj biljaka. Četiri tjedna nakon sadnje, zabilježen je postotak regeneriranih biljaka. Regenerirane biljke su one koje su razvile dva do tri listića i s njih su uzimani vegetacijski vršci, tehnikom disekcije, za pokus krioprezervacije. Vegetacijski vršci veličine 1 - 1,5 mm su disekcijom izdvojeni s mikroreznica postavljenih na medije sa antioksidansima. Vegetacijski vršci stavljeni su na medij za pretkulturu (M4) i zatim je nakon 72 sata proveden postupak krioprezervacije. Postupak krioprezervacije zbog ograničene količine materijala proveden je za svaku na razini dviju sorata ('Plavac mali' i 'Pošip bijeli') koristeći se pri tome svim mikroreznicama dobivenim u prethodnom pokusu. Krioprezervacija je provedena po metodi droplet-vitrifikacije prema Bettoni i sur., (2019). U postupku krioprezervacije prvi tretman je uranjanje eksplantata u LS otopinu (eng. *loading solution*) u trajanju od 20 minuta pri sobnoj temperaturi. LS otopina sadrži 2 M glicerola i 0.4 M saharoze u MS mediju. Postupak dehidracije je izveden 50 %-tnom otopinom PVS2 pri sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta i 100 %-tnom otopinom PVS2 pri temperaturi od 0 °C u trajanju od 50 minuta. Sterilna petrijeva zdjelica s otopinom i eksplantatima je bila smještena u posudici sa ledom kako bi se održala temperatura od 0 °C. Nakon toga su kapljice PVS2 otopine u volumenu od 0.01 mL dodane pipetom na komadić aluminijske folije. Eksplantati su stavljeni u kapljice PVS2 otopine. Zatim su se komadići aluminijske folije sa eksplantatima stavili u tekući dušik na 50 minuta. Eksplantati su stavljeni u US otopinu nakon vađenja iz tekućeg dušika. US otopina (eng. *unloading solution*) služi za vraćanje stanične tekućine i temperature eksplantata u stanje kakvo je bilo prije postupka krioprezervacije, a sadrži 0,2 M saharoze. Eksplantati su u US otopini bili 20 minuta. Nakon provedenog postupka eksplantati su stavljeni na regeneracijski medij (RM). Opažanje regeneracije je provedeno 8 tjedana nakon postupka krioprezervacije. Utjecaj svih nezavisnih varijabli vezanih uz prvi dio pokusa za dobivanje mikroreznica (medij, genotip, sanitarni status) te utjecaj sorte (u pokusu krioprezervacije) testirani su odvojeno jednosmjernom analizom varijance. Usporedba srednjih vrijednosti provedena je pomoću Duncan's multiple range testa. Sve analize provedene su korištenjem statističkog softvera XLSTAT 2022.1.1. (Addinsoft).

### Rezultati i rasprava

Utjecaj medija sa dodatkom različitih antioksidansa, genotipa i sanitarnog statusa prikazan je u tablici 3. na regeneraciju mikroreznica u predkulturi. Najveći postotak regeneriranih razvio se na mediju sa dodatkom glutaciona (94,44 %), što je statistički značajno u odnosu na medij sa dodatkom salicilne kiseline (61,76 %) koji je ostvario najmanji rezultat. Uspjeh regeneriranih biljaka na medijima sa askorbinskom kiselinom i kombinacijom antioksidansa je približno jednak. Regeneracija biljaka na razini genotipa ostvarila je približno jednake vrijednosti (70,19 – 85,92 %). Sanitarni status dao je široki raspon ostvarene regeneracije,

gdje je sanitarni status GLRaV-1 ostvario najvišu regeneraciju (89,58 %), statistički značajno različitu od sanitarnog statusa GLRaV-3 (45,83 %). Jedino je sanitarni status GLRaV-3 rezultirao samostalno nižim uspjehom regeneracije na razini svih genotipova. Ista činjenica je ranije potvrđena kod testiranja utjecaja sanitarnog statusa na svim trsevima genotipa PMC-16 (rezultati nisu prikazani), a uzrok mogu biti različite mutacije ili utjecaj različitih genotipova korištenih u istraživanju. Slabiji uspjeh rasta u *in vitro* uvjetima inficiranih genotipova sorata u istraživanju, ali i drugih sorata ranije je također potvrđen (Marković et al., 2015). Stoga je potrebno definirati protokol za *in vitro* uvjete za svaku pojedinu sortu, da bi se biotehnoški postupci ozdravljanja mogli primijeniti.

Tablica 3. Utjecaj medija sa dodatkom različitih antioksidansa, genotipa i sanitarnog statusa na regeneraciju mikroraznaka u kulturi tkiva

izvor varijabilnosti	razina	uspjeh regeneracije
Medij - antioksidansi	M_3	94.44 a
	M_2	79.29 ab
	M_4	78.60 ab
	M_1	61.76 b
Genotip	POŠ089	85.92 a
	PMC19	78.06 a
	PMC16	70.19 a
Sanitarni status	GLRaV-1	89.58 a
	bez virusa	79.09 a
	GFLaV1+GFLaV3	76.39 ab
	GFLV+GLRaV-1	75.00 ab
	GFLV	71.03 ab
	GLRaV-3	45.83 b

Proveden je pokus krioprezervacije na sortama 'Plavac mali' i 'Pošip bijeli' (Tablica 4.). Kontrola je korak koji prethodni smrzavanju i podrazumijeva izlaganje krioprotektantu PVS2 50 minuta. Smrzavanje je korak u kojem su eksplantati prošli sve korake protokola i završno su potopljeni u tekući dušik. Kao što je vidljivo iz prikazanih rezultata, sorta 'Pošip bijeli' je dala bolje rezultate u oba koraka, međutim bez značajne razlike među njima. U kontrolnom koraku sorta 'Plavac mali' je dala slabije rezultate (29.03%) u odnosu na smrzavanje (34.03%), što je suprotno od očekivanog. S obzirom da je prvi put ovaj protokol testiran na ovim sortama, može se zaključiti da su relativno visoke vrijednosti postignute za kontrolni, kao i za korak smrzavanja kod standardnog protokola krioprezervacije.

Tablica 4. Rezultat krioprezervacije metodom droplet-vitrifikacije na sortama 'Plavac mali' i 'Pošip bijeli'

Tretman	Sorta	Udio potjeralih eksplantata (%)
Kontrola	POŠ	52.70 a
	PMC	29.03 a
Smrzavanje	POŠ	47.20 a
	PMC	34.03 a



Slika 3. Eksplantat sorte 'Plavac mali crni' četiri tjedna nakon provedene krioprezervacije (kontrola)



Slika 4. Eksplantat sorte 'Pošip bijeli' četiri tjedna nakon provedene krioprezervacije (smrzavanje)

### Zaključak

S ciljem postavljanja banke gena vinove loze, na temelju rezultata ovog istraživanja možemo zaključiti da je moguće testirati protokole krioprezervacije na zaraženom biljnom materijalu, te da se uz pomoć antioksidansa može pospješiti rast istih u *in vitro* uvjetima. Međutim, za primjenu ovih tehnika potrebno je napraviti daljnja testiranja *in vitro* uvjeta i protokola krioprezervacije.

### Napomena

Istraživanja neophodna za ovaj rad dio su hrvatsko-srpskog bilateralnog projekta „*In vitro* razmnožavanje, krioprezervacija i kvantifikacija biološke aktivnosti plodova jagodastih vrsta voćaka i vinove loze“.

### Literatura

- Bettoni J.C., Bonnart R., Shepherd A., Kretschma A., Volk G.M. (2019). Successful cryopreservation of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' from both *in vitro* and growth chamber source plants. *Acta Horticulturae*. 1234:211–218.
- Halliwel B., Aeschbach R., Löliger J., Aruoma O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 33:601–617.
- Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2008). *Vinova loza – ampelografija, ekologija, oplemenjivanje*, Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga.
- Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I., Preiner D., Zdunić G., Bubola M., Stupić D., Andabaka Ž., Marković Z., Šimon S. (2015). *Zelena knjiga: hrvatske izvorne sorte vinove loze*. Zagreb, Hrvatska: Državni zavod za zaštitu prirode.
- Marković Z., Preiner D., Bošnjak A.M., Safner T., Stupić D., Andabaka Ž., Maletić E., Chatelet P., Engelmann F., Kontić J.K. (2014). *In vitro* introduction of healthy and virus-infected genotypes of native Croatian grapevine cultivars. *Central European Journal of Biology*. 9:1087–1098.

- Mirošević N., Karoglan Kontić J. (2008). Vinogradarstvo. Zagreb, Hrvatska: Nakladni zavod globus.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Reed B.M. (2008). Plant cryopreservation: a practical guide. 4-87. New York , SAD: Springer.

### **Influence of antioxidants in preculture of *in vitro* microcuttings on grapevine regeneration after cryopreservation**

#### **Abstract**

Cryopreservation protocols need to be tested for autochthonous cultivars on an infected and healthy plant material cause virus infection can be difficult in tissue culture. Antioxidants can improve the plant growth. The aim of this work was to establish the plant regeneration of infected plants in tissue culture conditions and testing a standard cryopreservation protocol for grapevine on them. Buds 1.5.mm-size of infected genotypes were inoculated on different MS (Murashige i Skoog) media with addition of 0.5 mg L<sup>-1</sup> 6-benzilaminopurina (BAP) and 0.05 mg L<sup>-1</sup> indol-3-acetic acid (IAA) with antioxidants (M1: 0.1 mM salycilic acid, M2: 1 mM ascorbic acid, M3: 1 mM glutathione and M4: combination of three antioxidants with mentioned concentrations) and *in vitro* growth was observed. From shooted plants apical meristems were excised and cryopreservation protocol was performed (LS-20', ½ PVS2-30' and PVS2-50' control and freezing). The highest *in vitro* growth was achieved on medium with addition of glutathione (M3). Infection has an effect on regeneration of plants, but has not effect on regeneration after cryopreservation.

**Key words:** growth *in vitro*, infected genotypes, antioxidants, regeneration, cryopreservation