

Otpornost populacije sjemenjaka AFZ-VV-15 × 'Graševina' na pepelnicu vinove loze

Čirjak, Matea-Tereza

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:410450>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-17**



Repository / Repozitorij:

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



Otpornost populacije sjemenjaka AFZ-VV-15 × 'Graševina' na pepelnicu vinove loze

Čirjak, Matea Tereza

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:810756>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-09-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Otpornost populacije sjemenjaka AFZ-VV-15 × 'Graševina' na pepelnicu vinove loze

DIPLOMSKI RAD

Matea Tereza Čirjak

Zagreb, rujan, 2022.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Hortikultura Vinogradarstvo i vinarstvo

**Otpornost populacije sjemenjaka AFZ-VV-15 ×
'Graševina' na pepelnicu vinove loze**

DIPLOMSKI RAD

Matea Tereza Čirjak

Mentor:
izv. prof. dr. sc. Darko Preiner

Zagreb, rujan, 2022.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Matea Tereza Čirjak**, JMBAG 0178103327, rođena 04.01.1994. u Zadru, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Otpornost populacije sjemenjaka AFZ-VV-15 × 'Graševina' na pepelnicu vinove loze

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Matea Tereza Čirjak**, JMBAG 0178103327, naslova

Otpornost populacije sjemenjaka AFZ-VV-15 × 'Graševina' na pepelnicu vinove loze

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Mentor: izv. prof. dr. sc. Darko Preiner

2. Član : prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić

3. Član: izv. prof. dr. sc. Zvezdana Marković

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Cilj istraživanja.....	2
2. Pregled literature	3
2.1 Pepelnica	3
2.2 Oplemenjivanje.....	8
2.2.1 Selekcija	10
2.3 Čimbenici otpornosti na pepelnicu	16
3. Materijali i metode.....	19
3.1 Lokacija i vrijeme	19
3.2 Biljni materijal (AFZ-VV-15 x 'Graševina')	19
3.3 Postupak križanja, berba i odvajanje sjemenki	20
3.4 Statifikacija	20
3.5 Naklijavanje i sjetva.....	22
3.6 Modificirani poljski uvjeti i evaluacija	24
4. Rezultati i rasprava.....	27
4.1 Količina i klijavost sjemenki dobivenih križanjem.....	27
4.2 Dinamika klijanja	28
4.3 Vizualna evaluacija otpornosti na pepelnicu	30
5. Zaključak	32
6. Popis literature	33

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Matea Tereza Čirjak**, naslova:

Otpornost populacije sjemenjaka AFZ-VV-15 × 'Graševina' na pepelnicu vinove loze

Vinarska i vinogradarska proizvodnja uglavnom se temelji se na plemenitim sortama vinove loze (*Vitis Vinifera L.*). Poznata je činjenica kako je europska (plemenita) loza vrlo osjetljiva na pepelnicu (*Erysiphe necator*) i niz drugih bolesti. Introdukcija bolesti i štetnika s drugih kontinenata u Europu uzrokovala slom tradicionalnog vinogradarstva. Vinova loza do tada nije bila u direktnom kontaktu s gljivičnim infekcijama i nije imala priliku stvoriti prirodnu otpornost. Rješenje je nađeno u primjeni kemijskih sredstava za zaštitu bilja, koja se posebice u vinogradarstvu koriste dugi niz godina u prevelikoj mjeri za buduću održivost. Oplemenjivanje, odnosno stvaranje otpornih sorti jedno je od adekvatnih rješenja ovom problemu koje je sve aktualniji. U ovom radu je opisan postupak stratifikacije, naklijavanja, sjetve u modificirane uvjete i na kraju evaluacija otpornosti sjemenjaka dobivenih križanjem AFZ-VV-15 x 'Graševina' na pepelnicu vinove loze. Evaluacija je provedena vizualnom ocjenom stupnja zaraze pojedinačnih biljaka korištenjem deskriptora OIV-455. Prikazani su rezultati istraživanih parametara – klijavost sjemenki, dinamika klijanja i otpornost uzgojenih sjemenjaka. Izdvojeno je šest genotipova s vrlo visokom otpornošću kao materijal za daljnje ispitivanje proizvodnih karakteristika. Prisutnost Ren3 gena zaslužnog za otpornost na pepelnicu potrebno je naknadno dokazati primjenom molekularnih markera. Precizna selekcija otpornih gena markerima i njihovo postupno uvođenje u nove linije sadnog materijala zahtjevnim oplemenjivačkim radom potencijalno je rješenje za smanjenje potrošnje sredstava za zaštitu bilja, uz zadržavanje organoleptičkih karakteristika *V. vinifere*.

Ključne riječi: *Vitis Vinifera*, pepelnica, *Erysiphe necator*, hibridizacija, oplemenjivanje, otporne sorte

Summary

Of the master's thesis – student **Matea Tereza Čirjak**, entitled

Resistance of the seedlings from the cross of AFZ-VV-15 × 'Graševina' on grapevine powdery mildew

Viticulture and wine production are traditionally based on European grapevine (*Vitis vinifera* L.). A well-known fact is European grapevines are very sensitive to powdery mildew (*Erysiphe necator*) and many other diseases. European traditional viticulture and wine production collapsed caused of the introduction of diseases and pests from other continents. The grapevine had no opportunity to develop natural resistance caused by lack of direct contact with fungal infections until then. The solution has been founded on the application of chemical plant protection products. They have been used in viticulture for many years to an excessive extent for future sustainability. Breeding, or the creation of resistant varieties, is one of the adequate solutions to this problem, which is becoming more and more relevant. This thesis describes the procedure of stratification, germination, sowing in modified conditions, and, finally, the evaluation of the powdery mildew resistance of the seedlings obtained by crossing AFZ-VV-15 x 'Graševina'. The evaluation was carried out by visual assessment of the degree of infection on individual plants by using the OIV-455 descriptor. The results are presented divided by investigated parameters – seed germination, germination dynamics, and resistance of the cultivated seeds. Six genotypes with very high resistance were selected as a material for further testing of production characteristics. The presence of the Ren3 gene responsible for resistance to powdery mildew needs to be proven later by using molecular markers. The precise selection of resistant genes with markers and their gradual introduction into new lines of planting through demanding breeding work is a potential solution to reducing the consumption of plant protection agents while maintaining the organoleptic characteristics of *V. vinifera*.

Key words: *Vitis vinifera*, powdery mildew, *Erysiphe necator*, hybridization, breeding, resistant varieties

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera L.*) je najrasprostranjenija voćna vrsta u svijetu, koja svojom ukupnom proizvodnjom nadmašuje sve ostale. Vinogradarska proizvodnja, pogotovo proizvodnja vina u svijetu temelji se na uzgoju sorata plemenite, europske ili tradicionalne vinove loze. Vrsta je izrazito polimorfna što u praksi znači da unutar jedne vrste razlikujemo veliki broj sorata. Broj se procjenjuje na 5 000 do 8 000 sorata, no samo njih 300 do 400 imaju veću komercijalnu važnost (Maletić i sur., 2008.). Smatra se da je plemenita vinova loza za kakvu znamo danas stvorena procesom domestikacije koja je započela na prostoru Transkavkazije te kasnijim prirodnim križanjem autohtone divlje loze i introduciranih kultiviranih loza koje su kolonizatori i nomadi antičkih civilizacija donijeli u Europu s prostora Male Azije (Maletić i Pejić, 2013. prema Maul, 2011.). Poznato je kako uzgoj vinove loze zahtjeva korištenje prevelike količine kemijskih sredstava za zaštitu od bolesti i štetnika. Prema potrošnji kemijskih sredstava vinogradarstvo zauzima nezavidno prvo mjesto u Europi u odnosu na druge poljoprivredne kulture. Procijenjeno je na razini Europske unije da sredstva za zaštitu vinove loze čine 40% ukupne potrošnje svih sredstava, a čak 70% ukupne potrošnje fungicida što se u budućnosti i suvremenom vinogradarstvu smatra neodrživim i ekološki neprihvatljivim. Usporedbe radi, vinogradarske površine zauzimaju samo 3% od ukupnih poljoprivrednih (Štambuk i Karoglan Kontić, 2021.).

Ekološki uzgoj vinove loze korištenjem klasičnih sorata je izuzetno otežan i zahtjeva primjenu značajnih količina sredstava na bazi sumpora i bakra. Kemijska sredstva svojim štetnim djelovanjem na okoliš i ljudsko zdravlje, unatoč tome što su efikasna, postaju sve manje prihvatljiv način borbe protiv štetnika. Europska unija direktivom (2009/128/EZ) uspostavlja okvire za djelovanje zajednice za postizanje održive upotrebe pesticida. Na snazi je od 2009. a traje i danas (<https://eur-lex.europa.eu/>). U svrhu povećavanja bioraznolikosti i uspostavljanja samoodržive poljoprivrede komisija europske unije razvila je niz strategija. Jedna od njih „Od polja do stola“ (*Farm to Fork*) predstavlja program unutar kojeg se do 2030. godine planiraju ispuniti svi postavljeni ciljevi uglavnom vezani za ekološku održivost i što manje pogodovanje klimatskim promjenama. Uz financijske potpore planira se 25% od ukupne poljoprivredne površine prenamijeniti za ekološki uzgoj koji u ovom trenutku koristi tek 7,5% poljoprivredne površine u Europi. Jedan od smjerova za rješavanje nevedenog problema je korištenje oplemenjivačkih tehnika i metoda u stvaranju otpornih sorata vinove loze i uzgoj istih. EU financira projekt INNOVINE (<https://www.innovine.eu>) u kojem sudjeluje 27 suradnika iz 7 zemalja. Cilj projekta je da razvija eko-prijateljsko vinogradarstvo u vidu smanjenje upotrebe pesticida u vinogradima zbog klimatskih promjena. Cilj je stvaranje sorti postojeće otpornosti na najvažnije bolesti (Adam-Blondon i sur., 2014.).

Kako bi oplemenjivači imali stabilan i dostupan izvor svih varijabilnih svojstava vrlo je važno očuvanje germplazme i matičnih nasada. Cilj oplemenjivačkih aktivnosti je dobivanje sorti svih poželjnih svojstava; naslijeđenu kvalitetu vinove loze uz stabilnu i trajnu otpornost drugih *Vitis* vrsta. Novostvoreni kultivar se dalje ispituje u proizvodnim okolnostima, prisutnost gena za otpornost dokazuje se molekularnim markerima, i konačno, registracija i dodavanje u nacionalnu sortnu listu, ukoliko ispunjava sve zadane kriterije.

Pepelnica (*Erysiphe necator*) je gljivična introducirana bolest na koju vinova loza nije imala priliku razviti prirodnu otpornost stoga se pri stvaranju otpornih sorti koriste američke i istočnoazijske vrste koje su evolucijski razvile jedan ili više gena rezistentnosti. Od 2007. godine do danas razvojem molekularnih markera dogodio se progresivan napredak u identifikaciji gena i njihove točne pozicije na kromosomima. Dokazano je 14 gena zaslužnih za ekspresiju otpornosti na pepelnicu u različitim stranim i divljim vrstama, čak i unutar *V. vinifera* vrste koja je inače iznimno osjetljiva na gljivična oboljenja. Posljednjih godina oplemenjivači nastoje učvrstiti poželjna svojstva gomilanjem (piramidizacijom) više gena otpornosti te kombiniranjem otpornosti na više štetnika u jednom genomu (pr. pepelnicu i plamenjaču). Sve navedeno predstavlja veliki korak napretka u oplemenjivanju i otvara mogućnost za nova, još efikasnija rješenja za ekološki održiv uzgoj vinove loze.

Unatoč tome što nije autohtona sorta, Graševina (sin. Talijanski rizling, Laški rizling, Olszrizling, Borba, Welschriesling i dr.) je naša gospodarski najvažnija sorta jer čini četvrtinu (24%) ukupne domaće proizvodnje te se smatra udomaćenom (Andabaka i sur., 2021.). Podrijetlo joj nije točno utvrđeno, a različiti autori navode mnoge pretpostavke od kojih se do sada nijedna nije znanstveno utvrdila. Najviše se uzgaja u vinogradarskim regijama Zapadna i Istočna kontinentalna Hrvatska, a Slavonija i Hrvatsko Podunavlje su najistaknutiji položaji i vinogorja. Jedna od teorija o mogućem podrijetlu je da je autohtona sorta Podunavlja što se navodi u knjizi „Grape varieties“ (Robinson, J. i sur., 2012.). Godine 2019. je prema podacima vinogradarskog registra APPRRR (<https://www.apprrr.hr/>) zauzimala 4 563, 62 ha.

1.1 Cilj istraživanja

Cilj rada je provesti vizualnu evaluaciju te utvrditi razliku u otpornosti na pepelnicu kod sjemenjaka dobivenih križanjem otpornih genotipova populacije AFZ-VV-15 i sorte 'Graševina'.

2. Pregled literature

2.1 Pepelnica

Fitopatogene gljive i psudogljive koje su introducirane iz drugih dijelova svijeta nazivaju se neomicete. Patogene neomicete koje uzrokuju bolesti vinove loze introducirane su krajem 19 stoljeća iz Sjeverne Amerike. Dvije najvažnije su *Plasmopara viticola*, uzročnik plamenjače vinove loze te *Erysiphe necator* (sinonim *Uncinula necator*, anamorf- *Oidium tuckerii*), uzročnik pepelnice vinove loze. Pepelnica se u Europi odnosno u okolici Londona prvi pojavila 1845. godine kao prva introducirana bolest vinove loze. Kroz sljedećih šest godina proširila se po cijelom Sredozemlju (Cvjetković, 2010.). Mediteranska klima uvelike pogoduje razvoju bolesti. Na našem području najugroženija područja su Istra, Dalmacija i posebice otoci, iako je sve veća pristupnost bolesti i u kontinentalnim predjelima.

Simptomi pepelnice očituju se na svim zelenim dijelovima biljke: mladicama, viticama, listovima, peteljka lista, cvatu, bobama i rozgvi. Na mladicama su simptomi vidljivi od samog izlaska iz pupa, ukoliko se radi o ranoj zarazi, sve do odrvenjavanja. Zaražena mladica je presvučena pepeljastom prevlakom (slika 2.1.1).



Slika 2.1.1 Zaražena mladica sa simptomima pepelnice (izvor: <https://medijmurje.hr/aktualno/ziva-zemlja/pepelnica-u-vinogradu-donosi-plijesan-i-kiselu-trulez-grozda-16317/>)

Naličje lista je uslijed zaraze manje ili više prekriveno pepeljastom, sivo - bijelom prevlakom, a rubovi plojke se blago uvijaju. Listovi mogu biti napadnuti u bilo kojem razvojnom stadiju (slika 2.1.2) Posljedice se javljaju kao nekroze, zaostatak u rastu te uvijanje rubova, ali i potpuno sušenje i otpadanje lista. Simptomi su u kontinentalnom dijelu naše zemlje uglavnom vidljivi tek u ranu jesen, na starijem lišću.



Slika 2.1.2 Simptomi pepelnice na listu sjemenjaka

Na cvatu su također vidljivi simptomi bolesti, a najjači napad je obično prije oplodnje i tada uzrokuje sušenje i opadanje cvijetova (slika 2.1.3).



Slika 2.1.3 Cvat prije oplodnje i inficirane tek zametnute bobe (izvor: Šubić, 2021.)

Tipični simptomi nastaju na bobama u vidu pepeljaste prevlake koja potječe od micelija i oidia. Očituju se od faze samog zametanja sve do početka faze dozrijevanja ili šare. U slučaju rane zaraze, zadebljana epiderma bobe puca te nastaju pukotine do samog endokarpa (slika 2.1.4). Pukotine su, uz pepeljasti mašak, jedan od tipičnih simptoma bolesti. Kod kasnih napada štete obično nisu velike, osim kod bijelih stolnih sorata na kojima se vide tamne mrežaste zone.



Slika 2.1.4 Pucanje bobice kao posljedica infekcije (izvor: Cindrić i sur., 2019.)

Posljedica je manja tržišna vrijednost grožđa jer je općenito vanjski izgled ploda najvažniji kriterij pri određivanju kvalitete i vrijednosti stolnog grožđa (slika 2.1.5). Zaraženi grozdovi i biljke su skloniji kasnijem razvoju truleži i plijesni tokom rujna (Šubić, 2021.; Cvjetković 2010.).



Slika 2.1.5 Grozd napadnut pepelnicom (lijevo) u odnosu na zdravi (desno) (izvor: [file:///C:/Users/Admin/Downloads/syngenta - pepelnica vinove loze erysiphe necator uncinula necator - 2020-06-08.pdf](file:///C:/Users/Admin/Downloads/syngenta_-_pepelnica_vinove_loze_erysiphe_necator_uncinula_necator_-_2020-06-08.pdf))

Gljiva može prezimiti kao vegetativno tijelo (miceliji ili oidiji) u zaraženim pupovima (3,4,5 i 6 pup) te u obliku okruglih zatvorenih plodišta, odnosno spolnih plodnih tijela (kleistoteciji) na otpalom lišću (slika 2.1.6), rozgvi, pukotinama kore, na tlu i sl. Kleistoteciji se stvaraju krajem vegetacijske sezone.



Slika 2.1.6 Odrasli kleistotecij na listu

(izvor:<https://bladmineerders.nl/parasites/fungi/dikarya/ascomycota/pezizomycotina/leotiomyces/leotiomycetidae/helotiales/erysiphaceae/erysiphe/erysiphe-necator/>)

Okruglasto spljoštenog su oblika te na površini imaju 8 – 30 dugih privjesaka (apendicese) sa uvinutim kukastim krajevima. Također, sadrže 4 – 6 askusa (rijeđe 6 – 9) odnosno sporogene organe koji stvaraju 4 – 7 jajolikih do elipsoidnih askospora (slika 2.1.7). Askospore su endogene nespolne rasplodne stanice. U proljeće, nakon kiša, kleistoteciji pucaju i izbacuju askospore čije oslobađanje započinje otvaranjem prvih listića, a proces traje najčešće 5 tjedana. Askospore inficiraju zelene dijelove biljke te nakon inkubacije (25 °C za 4 dana; 10 °C za 8 dana) dolazi do sekundarne infekcije.



Slika 2.1.7 Kleistotecij (askusi, askospore, apendicese s kukastim završecima)

(izvor:<https://bladmineerders.nl/parasites/fungi/dikarya/ascomycota/pezizomycotina/leotiomyces/leotiomycetidae/helotiales/erysiphaceae/erysiphe/erysiphe-necator/>)

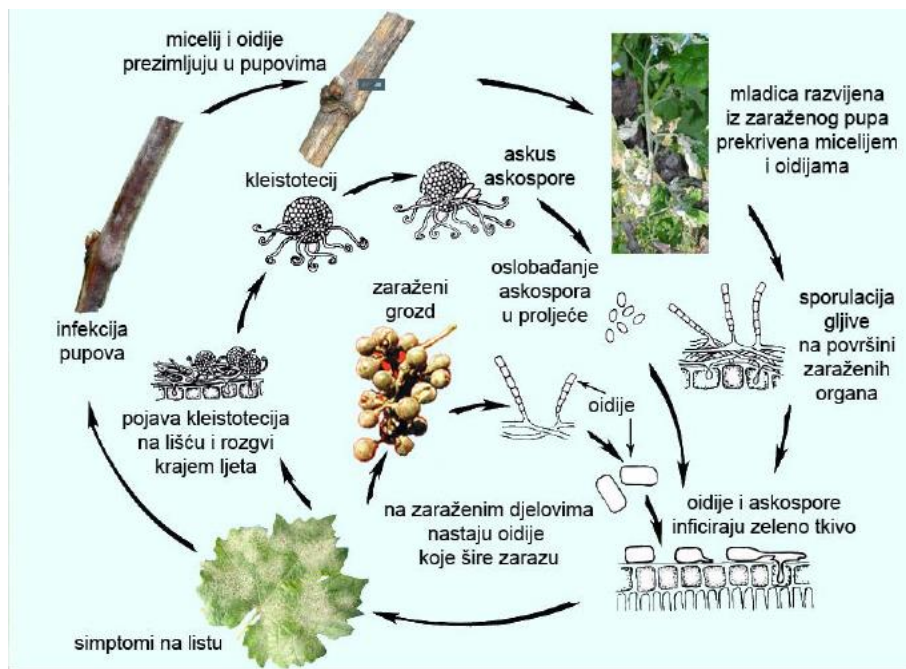
Zaraza se očituje kao pepeljasta prevlaka na površini organa što znači da gljivica pripada skupini ektoparazita. Crpi hranu iz stanica domaćina putem sisaljki, odnosno kuglastim haustorijama. Spore se šire anemofilijom (vjetrom) i na taj način dolazi do infekcije okolnih biljaka, dijela ili cijelog vinograda, a načinom prezimljavanja prenosi se zaraza u sljedeću vegetacijsku sezonu (izvor: <https://pinova.hr/>).

Prema Šubiću (2021.) na prezimljenje micelija ili konidija pepelnice u pupovima nepovoljno može djelovati izloženost niskim zimskim temperaturama manjim od -15°C (-21°C u trajanju od 5 h značajno umanjuje mogućnost prezimljenja). Općenito, povoljni uvjeti razvoja pepelnice su pri temperaturama zraka već od 6 do 32°C , ali optimalna vrijednost je od $20 - 27^{\circ}\text{C}$. Temperature zraka veće od 35°C nepovoljno utječu na infekciju, a mortalitet oidija izražen je pri temperaturama većim od 40°C . Oidije kliju već pri temperaturama većim od $5,6^{\circ}\text{C}$. Klijanje oidija pri 25°C traje samo pet sati, a razdoblje od inokulacije do pojave novih infektivnih stanica pri 23 do 30°C traje šest do sedam dana. Difuzna svjetlost, lagano strujanje zraka (1 km/h), naoblaka i vlažnost zraka 40 do 100 % optimalni su uvjeti za širenje bolesti u vinogradu (Cvjetković, 2010.). Prognozu pojave pepelnice temeljem meteoroloških pokazatelja teže je predvidjeti nego pojavu sive plijesni i plamenjače. Na tablici je prikazano vrijeme vlaženja potrebno za početak infekcije askosporama (tablica 2.1.1).

Tablica 2.1.1: Vrijeme vlaženja potrebno za infekcije askosporama (izvor: Cvjetković, 2010.)

Temp. zraka ($^{\circ}\text{C}$)	Vlaženje (sati)
5,5	40
8,3	23,3
10	19,3
15,5 - 16,1	13,3
17,2 - 23,8	12
25	14
25,5	17,3

Pepelnica je policiklička bolest (slika 2.1.8), dakle prizvodi i sekundarni inokulum. Primarni inokulum, točnije micelij s konidijama inficira površinu lista, dok se sekundarni odnosi na prezimljujuću strukturu odnosno kleistotecij. Primarnim inokulumom se spadaju askogonij (ženski) i anteridij (muški) te stvaraju potomstvo (kleistotecij). Kleistotecij se naziva i „savršena“ struktura koja je glavni uzrok, uz klimatske promjene i blage zime, sve većoj prisutnosti pepelnice. Savršeni stadij omogućuje bolje prezimljenje bolesti u vinogradima, raniji i agresivniji epidemiološki razvoj, te nastajanje novih formi koje se razlikuju u virulentnosti i razvoju rezistentnosti na neke skupine fungicida.



Slika 2.1.8 Životni ciklus pepelnice (izvor: Cvjetković,2010.)

Zbog takvog načina prezimljavanja i globalne promjene klimatskih prilika prosječna zaraženost netretirane sorte Pušipel (sin. Šipon, Moslavac, Furmint) u međimurskom vinogorju porasla je u posljednjoj dekadi (2011-2020) za 91,04% u odnosu na prethodnu (2001-2010) kada je iznosila 57,26%. Podaci iz 1970-ih ukazuju da je tada prosječna zaraza iznosila tek 5% (Šubić, 2021.; Cvjetković,2010.). Iz ovih podataka daje se zaključiti da je šteta od pepelnice postala značajno veća nego štete koje uzrokuje plamenjača. Molekularnim istraživanjima pepelnice u europskim vinogradima (Francuska, Austrija, Italija, Španjolska) utvrđeno je postojanje dvije genetski različite skupine *Erysiphe necator* odnosno grupa A i B. Grupa A prezimljuje u zaraženim pupovima, grupa B u kleistotecijama. Frekvencija u vinogradima je različita i mogu biti prisutne obje grupe u jednom vinogradu. Skupine se značajno razlikuju prema patogenosti te prema rezistentnosti na određene skupine fungicida. Grupa B se smatra agresivnijom po zaraznosti, ali ima dužu inkubaciju i manje vidljive početne simptomne od grupe A (Montarry i sur.,2008.). Stvaranje i selekcija tolerantnog i otpornog sadnog materijala upravo je rješenje za pojavu sve jače rezistentnosti i smanjene učinkovitosti kemijskih sredstava za zaštitu.

2.2 Oplemenjivanje

Oplemenjivanje vinove loze prema Maletiću i sur., (2008.) predstavlja skup metoda i postupaka pomoću kojih se stvara osnova za proizvodnju sadnog materijala poboljšanih nasljednih svojstava koja se prenose s roditelja na potomke i kao takva se zadržavaju

vegetativnom propagacijom. Beljo, (2012.) definira hibridizaciju kao ukupne aktivnosti oplemenjivača pri križanju roditeljskog para različitih genetskih konstitucija koje rezultira potomstvom novih genetskih kombinacija. Hibridizacija kao cilj ima formiranje maksimalno varijabilne populacije iz kojih će se selekcionirati genotipovi najpoželjnijih i najstabilnijih karaktéristika za daljnji razvoj kultivara poboljšanih svojstava. Variranje u biljnom svijetu znači pojavu razlika u ekspresiji svojstava među individuuama jedne populacije ili između populacija. Razlike mogu biti morfološke, fiziološke, fenološke, razlike u sadržaju kemijskih tvari, razlike u otpornosti na napad bolesti i štetnika i slično. Varijabilnost unutar vrsta ili sorti (varijeteta) vinove loze je širokog dijapazona, a prema načinu nastanka razlikuju se nenasljedno ili okolinski uvjetovano variranje i nasljeno variranje. Generativno razmnožavanje osigurava pojavu varijabilnosti vinove loze za potrebe oplemenjivanja. Beljo, (2012.) ističe varijabilnost kao temelj oplemenjivanja, a kao cilj stvaranje elitne biljke najboljih gospodarskih i bioloških karaktéristika. Oplemenjivački ciljevi se, naravno, razlikuju ovisno o aktualnim trendovima i potrebama vinogradarstva iako im je suštinski cilj jednak, a to je poboljšanje svojstava.

Kao preduvjet dobivanja elitne biljke, vrlo je važno pomno odabrati roditeljski par koji će svoja svojstva prenijeti na potomke. Cindrić, (2019.) navodi kako je osnovno pravilo kod izbora roditeljskog para korišćenje ranije stvorenih, poznatih genotipova koji posjeduju poželjne osobine. Oplemenjivači diljem svijeta i već dugi niz godina laički rečeno surađuju dijeleći svoja iskustva i nova saznanja o genetskim osobinama i fenološkim svojstvima sorata. Kroz povijest uzgoja dužu od par tisuća godina sorte vinove loze nastajale su spontanom križanjima i/ili mutacijama i induciranim (kontroliranim) križanjima.

Hibridi dobiveni križanjem između dva varijeteta (sorte) unutar vrste *V. vinifera* nazivaju se intraspecijski hibridi, a oni dobiveni križanjem *V. vinifera* s drugim *Vitis* vrstama su interspecijski hibridi. Križanje plemenite loze s drugim vrstama najčešće je u svrhu postizanja otpornosti na glavne bolesti i štetnike koje sama ne posjeduje, a provodi se od introdukcije bolesti i štetnika u Europu sa drugih kontinenata. Posljednje vrijeme se ispituju svojstva hibrida križana s istočnoazijskom vrstom *V. amurensis* koja nosi gene zaslužne za otpornost na hladnoću. S druge strane, intraspecijsko križanje provodi se već dugi niz godina od strane vinogradara, a cilj je dobivanje potomstva poželjnih proizvodnih karaktéristika. Postizanje višeg prinosa ili tzv. hibridizacija na prinos jedan je od prvih ciljeva oplemenjivačke prakse (Beljo, 2012.), kao i oplemenjivanje na kvalitetu u cilju povećanja šećera i kiselina u grožđu te postizanja boljih organoleptičkih svojstava vina. Najistaknutiji primjer intraspecijskog hibrida je sorta Müller-Thurgau (Rizvanac) koja je stvorena 1882. u njemačkom institutu za uzgoj grožđa (Eibach i Töpfer, 2015.), a prvi intraspecijski hibrid stvoren 1855. godine u Francuskoj je Alicante Bouschet (Petit Boschet x Grenache) kojeg se zbog obojenog mesa naziva „bojadiserom“ (Cindrić, 2019.).

Hibridizacija s prelaskom na ispitivanje klonskih linija danas je najčešća metoda klasičnog oplemenjivanja voćaka i vinove loze (Grubišić A., 2020. prema Jurak, 2013.). Neovisno koja metoda oplemenjivanja se primjenjuje, ono u svojoj osnovi predstavlja genetsku

rekombinaciju i fiksiranje vrijednih agronomskih svojstava u linijama potomstva stoga je najvažniji odabir dobrih roditelja. Roditelji koji se koriste u oplemenjivačkim programima dijele se na lokalne sorte prilagođene uvjetima okoline u kojima će se novi kultivar razvijati i germplazmu odabranu zbog poželjnih svojstava, neovisno o prilagodljivosti uvjetima nove okoline (Beljo, 2012.). Današnji sortiment prema Žulj (2017.) sadrži sorte stare stotine i tisuće godina zahvaljujući tradicionalizmu i vegetativnoj propagaciji i novonastale sorte koje nastaju seksualnom reprodukcijom. Različiti genetski izvori su vrijedan resurs svih poželjnih karakteristika, a oplemenjivački programi služe usavršavanju i očuvanju istih.

2.2.1 Selekcija

Osnovni cilj selekcije je poboljšanje sortimenta bilo koje poljoprivredne kulture pa tako i vinove loze. Predstavlja jedan od najvažnijih faktora napretka. Prva selekcija započela je domestikacijom vinove loze kada su od strane čovjeka odabrani odgovarajući genotipovi populacije divlje loze (*Vitis vinifera subsp. Sylvestris*) u prirodi. Provodila se neprestano i svugdje u svijetu uspredno s razvojem vinogradarstva, a provodi se i danas. Morfološka varijabilnost i generativno razmnožavanje uzroci su brojnih razlika unutar istog podroda, vrste, sorte ili genotipa te predstavljaju temelj selekcije (Cindrić, 2019.; Žulj, 2017.). Najbolji genotipovi odabrani selekcijom zadržavaju svoja svojstva daljnim vegetativnim načinom razmnožavanja. Mirošević (2007.) navodi kako su potomci vegetativnog razmnožavanja genetički identični majčinskoj biljci a pri tome nije važan način na koji je majčinska biljka nastala (vegetativno ili generativno).

Introdukcija se odnosi na izbor i donošenje sorte ili genotipa u područje u kojem se do tada ista nije uzgajala. Kod odabira sorte za introdukciju važno je ranije utvrditi hoće li uzgojem na novom području ostvariti svoja biološki i proizvodni potencijal. Najbolji primjer introdukcije je rasprostranjenost francuskog autohtonog sortimenta u gotovo svim vinogradarskim regijama svijeta.

Klonska selekcija odnosi se na odabir najboljih genotipova unutar iste sorte u svrhu zadržavanja poželjnih osobina vegetativnim razmnožavanjem. Klonovi su potomci dobiveni upravo na takav način i svi su identični majčinskoj biljci i međusobno. Klonske razlike očituju se najčešće u proizvodnim, morfološkim, fenološkim i organoleptičkim svojstvima, a selekcija je ponajviše usmjerena u odabir genotipova s visokim prinosom i kvalitativnim potencijalom. Kao glavni razlog postojanja razlika unutar klonova navodi se spontana genetska mutacija. Mutacija je trajna promjena na razini DNA koju uzrokuju abiotski i biotski faktori. Negativna selekcija odnosi se na isključivanje nepoželjnih genotipova (najčešće klonova koji su doživjeli spontanu mutaciju), a pozitivna na odabiru istih ili genotipova boljih karakteristika. Masovna selekcija (pozitivna i negativna) je najjednostavniji način izabiranja trsova koji će biti ostavljeni ili isključeni iz vinograda. Individualna selekcija podrazumjeva odabir najboljeg trsa iz vinograda i ostvarivanje potomstva od istog vegetativnim putem (Cindrić, 2019.). Selekcijom se, dakle

odabiru biljke (genotipovi) poželjnih svojstava za daljnji uzgoj ili oplemenjivačke programe, a vegetativnim razmnožavanjem ta je svojstva moguće neograničeno zadržati.

2.2.2 Oplemenjivanje kroz povijest

Vinova loza je vrlo osjetljiva na napade štetnika. Plamenjača (*Plasmopara viticola*), siva plijesan (*Botrytis cinerea*) i pepelnica (*Erysiphe necator*) su najpoznatije bolesti vinove loze. Korijenovom sustavu najpogubnija je trsna uš ili filoksera (*Daktulosphaira vitifoliae*). Navedeni štetnici su gotovo u potpunosti uništili europsko tradicionalno vinogradstvo u 19.st. Crni period nastupio je prvo introdukcijom filoksere s američkog na europski kontinent 1838. godine, zatim nekoliko godina kasnije pojavom pepelnice i plamenjače (peronospore). Gluhic i Kalić (2008.) navode kako je do tada jedini poznati štetnik vinove loze bio groždani moljac, čiji se napadi razlikuju ovisno o godini, ali uglavnom nisu uzrokovali gospodarske štete većih razmjera. Posljedično, pojavila se potreba za hitnim alternativnim rješenjima za uzgoj ove tradicionalne i gospodarski iznimno važne kulture. Vrlo brzo osnovan je Vinogradarski institut u Klosterneuburgu u Austriji, a uskoro se i u ostatku Europe osnivaju slični vinogradarski instituti ili razvojne stanice sa istim ciljem – obnova europskog vinogradarstva (Gluhić, 2008.). Posljedica uništenja vinogradarstva najbolje se očituje na ekonomskim i demografskim prilikama toga doba. U razdoblju između 1875. i 1889. godine samo u Francuskoj proizvodnja je smanjena s 85 mil. hektolitara na 23. mil. hektolitara. Neke od sorti su potpuno izumrle dok je veliki broj na rubu opstanka (Hrgović Štir, 2018.; prema Augé-Laribé, 1950.). Isto se odrazilo i na naš soriment koji je prema Maletiću i sur. (2008.) obuhvaćao oko 400 sorata što autohtonih, što introduciranih, a ta se brojka drastično smanjila pojavom štetnika.

Rješenje problema europskih vinograda razvijalo se u dva smjera; razvijanje kemijskih sredstava za suzbijanje bolesti i stvaranje novih sorti metodama hibridizacije koje će biti otporne na štetnike i bolesti (Karoglan Kontić, 2014.). Kao odgovor struke na aktualnu situaciju pronađeno je rješenje u primjeni velikog spektra kemijskih sredstava za zaštitu bilja, točnije fungicida. Prva sredstva su bila na bazi sumpora i bakra, a kasnije su razvojem kemijske industrije otkrivena i brojna sredstva koja sadrže umjetno sintetizirane aktivne tvari (Gluhić, 2008.). Francuski botaničar Millardet otkrio je 1885. godine fungicidno djelovanje sumpora i bakra na pepelnicu i plamenjaču, a ta se formula koristi i dan danas u obliku „bordoške juhe“. Problemu gljivičnih bolesti doskočilo se primjenom sredstava, no to nije bilo moguće i u slučaju rješavanja problema filoksere ili trsne uši. Jedino rješenje koje je tada bilo izgledno je cijepljenje tradicionalnih, osjetljivih *Vitis vinifera* sorata na podloge koje su stekle prirodnu otpornost na gljivične bolesti. Prvo cijepljenje na svjetskoj razini predložili su znanstvenici sa američkog sveučilišta Harvard 1822. godine (Eibach i Töpfer, (2015.)), a prvo cijepljenje u Europi ostvareno je 1872. godine (Karoglan Kontić, 2014.). Oplemenjivanje se u prošlosti pokazalo korisnijim u stvaranju novih podloga od američkih *Vitis* vrsta, a manje u stvaranju novih sorata vinove loze. Prve introducirane podloge američkih i azijskih vrsta na vapnenačkim tlima u

Europi ipak nisu mogle postići jednaku razinu rezistentnosti i nisu imale sposobnost dobrog ukorjenjavanja u novim uvjetima. Iz tog razloga se pojavila potreba za križanjem američkih vrsta raličitih karakteristika i dobivanjem odgovarajućih podloga. Podloge stvorene križanjem krajem 19. st. kao npr. Riparia Gloire de Montpellier, Ruggeri 140, Richter 99 i 110, Paulsen 1103, Teleki 5 C, Kober 125 AA i 5BB i druge (Töpfer i sur., 2011.). Te podloge su i danas u širokoj primjeni i može se reći da su najuspješniji produkt oplemenjivačkih programa do sada.

Ta metoda koristi se i danas u loznom rasadničarstvu u proizvodnji sadnog materijala. Međutim, ondašnjim znanstvenicima se nametnula potreba za pronalaskom „idealne“ sorte. Tako se pojavila ideja o oplemenjivanju ili hibridizaciji prvih međuvrskih (interspecijes) križanaca. Premda su američki *Vitisi* otporniji na određene bolesti, proizvodni i gospodarski potencijal im je slabiji od tradicionalne vinove loze. Stoga se stvorila potreba za poboljšavanjem enoloških karakteristika i kvalitete križanjem sa europskom plemenitom lozom, i obrnuto. Ideja je bila stvaranje sorte koja bi objedinjavala karakteristike otpornosti na filokseru i gljivične bolesti nasljeđene od jednog roditelja i kvalitetu nasljeđenu od drugog roditelja. Prvi direktnorodni hibridi nastali su 1875. godine u Francuskoj križanjem osjetljive plemenite loze *Vitis vinifera* sa otpornim američkim vrstama loze (*Vitis riparia*, *Vitis berlandieri*, *Vitis rupestris* itd.). Francuski hibridi su se raširili i u našim krajevima, a u narodu su poznati i pod nazivima „direktori“ ili „tudumi“ (Karoglan Kontić, 2014.). Nakon uvođenja fungicida kao mjere za suzbijanje pepelnice i plamenjače Francuska, a zatim i druge zemlje Europe zabranjuju uzgoj direktno rodni hibrida. U Hrvatskoj prema Zakonu o vinu (NN 32/2019) još uvijek stoji odredba da se od ovih sorata ne smije proizvoditi vino za tržište. Razlog tomu su negativne senzorne karakteristike i povišen sadržaj štetnog metanola u vinima dobivenim od direktno rodni hibrida. „Foxy miris“ najčešća je negativna karakteristika koju se veže za takva vina. Kemijski spoj koji uzrokuje miris je metil-antranilat. Ova negativna karakteristika američkih *V. labrusca* sorti degradira vino u najnižu proizvodnju kategoriju. Osjetilni prag za navedeni spoj iznosi oko 35 - 40 ppm, a njegova količina u grožđu znatno varira u različitim godinama. Iako su tada bili neprihvaćeni od strane proizvođača i potrošača, prvi interspecifični križanci danas predstavljaju genetičku osnovu za stvaranje novih otpornih križanaca poželjnih enoloških karakteristika pomoću suvremene tehnologije. Vodeću ulogu u stvaranju interspecifičnih križanaca danas imaju njemački instituti (Freiburg, Geisenheim, Geilweilerhof, Alzey, Wurzburg, Weinsberg). Na stvaranju interspecifičnih križanaca radi se intenzivno i u Americi, gdje se ističe Poljoprivredna razvojna stanica Cornell sveučilišta (Gluhić, 2008.).

2.2.3 Klasične metode oplemenjivanja

Klasičan postupak oplemenjivanja više se temelji na iskustvu oplemenjivača nego na teoretskim saznanjima (Adam-Blondon i sur. 2011.). Empirijske metode oplemenjivanja iznimno su zahtjevan i dug proces i pod utjecajem klimatskih prilika, a ekspresija poželjnih

gena nije uvijek garantirana. Prema Nikoliću (2012.), od križanja do samo pojave prvih plodova treba proći tri godine, a oplemenjivački proces ukupno traje 25 – 30 godina, tvrde Eibach i Töpfer, (2015). Zbog navedenog, molekularne metode selekcije imaju značajne prednosti u oplemenjivanju pred klasičnima (Cindrić, 2019.). Ipak, za najveći napredak u oplemenjivanju vinove loze ključna je kombinacija klasičnih metoda oplemenjivanja sa modernim biotehnološkim metodama (Nikolić, 2012.) koje skraćuju proces same selekcije.

Primarni postupak je odabir roditeljskog para za križanje. Ukoliko majčinska biljka ima morfološki i funkcionalno hermafroditan cvijet tada je potrebno izvršiti emaskulaciju odnosno uklanjanje prašnika nekoliko dana prije očekivane cvatnje. Optimalno vrijeme emaskulacije određuje se prema boji cvjetne pobijeli i kada se bazalni cvijetovi na cvatu počinju otvarati. Obavljanje ove operacije po jakom suncu može izazvati oštećenja tučka. Nakon postupka potrebno je izolirati cvat svjetlom vrećicom prozračnog materijala da nebi došlo do samooplodnje. Ukoliko, s druge strane, majčinska biljka ima morfološki hermafroditan, a funkcionalno ženski cvijet, tada je postupak križanja uvelike lakši jer nema potrebe za emaskulacijom (Cindrić, 2019.). Autohtone sorte sa funkcionalno ženskim cvjetovima su Grk i Dićeša ranina. Ženski cvijet ima karakteristične prašnike savijene prema dolje i prema tome ga je lako prepoznati. Cvat je prije inducirane oplodnje svježno potrebno izolirati vrećicom zbog mogućnosti stranooplodnje (slika 2.2.3.1). Kada se na tučku pojavi kapljica sekreta, spreman je za oplodnju i stavljanje svježeg muškog cvata s polenom u vrećicu. Slijedeće dane se vrećica u par navrata protrese ili se po potrebi može dodati još polena u nju.



Slika 2.2.3.1 Izolirani funkcionalno ženski cvatovi prije oplodnje polenom (izvor: Grubišić, 2021.)

Sjemenke dobivenih hibrida se nakon berbe izoliraju iz bobica, a daljnji postupci stratifikacije, naklijavanja i sjetve sjemenjaka te evaluacija njihovih svojstava smatraju se drugim korakom oplemenjivačkog procesa koji je detaljnije opisan poglavljem materijali i metode. Odabiru se sjemenjaci koji su pokazali najveću prisutnost traženog svojstva. Treći korak je sadnja

sjemenjaka u poljske uvjete i ispitivanje proizvodnih i bioloških karakteristika genotipa dobivenih križanjem. Daljni postupci utvrđivanja prisutnosti gena obavljaju se pomoću markera na molekularnoj i genetskoj razini.

Metode hibridizacije koje se odabiru za oplemenjivanje ovise o cilju, odnosno svojstvima kultivara koji se žele dobiti križanjem. Prema Cindriću (2019.), neke od metoda su povratno križanje (*backcross*), križanje bliskog srodstva (*inbreeding*), dvostruko križanje (*double-cross*) itd. Razlikuju se u broju roditelja i potomaka odnosno dobivenih generacija. Prema tome, hibridi se dijele na jednolinijske, dvolinijske, trolinijske itd. (Beljo, 2012.). Ovisno o cilju oplemenjivanja, hibridizacija može biti: na otpornost prema bolestima i štetnicima, otpornost prema abiotским stresorima (suša, hladnoća) na prino, na kvalitetu i slično.

2.2.4. Razvoj i primjena tehnike molekularno-genetičkih markera

Razvojem molekularno-genetskih alata i otkrivanjem MAS-a (*Marker Assisted Selection*-markerom potpomognuta selekcija) omogućen je ogroman napredak u selekciji najboljih genotipova među roditeljima i potomcima na temelju genetske osnove, a ne fenotipskih obilježja biljke. Omogućena je, također, selekcija i „lociranje“ kvalitativnih gena odgovornih za ekspresiju poželjnih, točno određenih svojstava. Sve navedeno je značajno utjecalo na kvalitetu, preciznost i brzinu oplemenjivačkih programa. Markeri su svojom primjenom posljednjih godina uvelike pojednostavili proces križanja ranijom selekcijom (već u fazi klijanja) čime se eliminira velik dio ispitivane populacije i postupak čini praktičnijim prostorno i vremenski. Isključena je mogućnost pojave „*linkage drag*“ tj. prenošenja štetnih i nepoželjnih gena na potomstvo i značajno umanjena mogućnost sloma otpornosti. (Collard i sur., 2005.). Također, isključuje se mogućnost pojave *inbreeding* depresije i pojava urođenih poremećaja kao posljedica homozigotnosti zbog križanja dva srodna, genetski slična roditelja (Alvarez i sur., 2009.).

Karakterizacija sorti tradicionalnim ampelografskim metodama (opažanje, opisivanje i mjerenje morfoloških i bioloških svojstava) ovisi o razvojnom stadiju biljke, starosti promatranog organa, kao i uvjetima sredine u kojima se biljka nalazi. Utjecaj okolišnih čimbenika na fenotip će uvijek biti ograničavajući faktor u ampelografiji unatoč znatnom napretku u sistematizaciji, razradi i uniformizaciji opisnih metoda od strane organizacija koje se obave zaštitom genetičkih resursa (OIV, UPOV i ECPGR). Najveći napredak ostvaren je uvođenjem deskriptora u OIV sustav 1983. godine. Nedostatak ampelografskih metoda očituje se i kod opisivanja morfološki sličnih sorata koje su u međusobnom srodstvu jer ih je teško ili nemoguće razlikovati (Žulj, 2017.; Cindrić 2019.). Suprotno tome, klonovi nastali od iste sorte imaju gotovo identičan genetski profil a fenotip im se može značajno razlikovati (Beljo, 2012.) Identifikacija biljaka u juvenilnoj fazi je također nemoguća jer se tipične morfološke karakteristike odrasle biljke ne očituju do pete godine starosti. Razvojem tehnologije i napretkom u znanosti, pa tako i molekularno genetičkih metoda, identifikacija sorata je danas

neusporedivno brža, preciznija i jeftinija. Shodno tome, tradicionalne ampelografske metode uvelike gube svoj značaj i sve su manje u rutinskoj upotrebi. Međutim, neizostavne su za determinaciju i verifikaciju statusa genotipova u visokopouzdanim kolekcijama vinove loze pri prikupljanju uzoraka biljnih tkiva za metode DNA identifikacije, kao i za uspostavljanje baze podataka molekularnih profila (Žulj, 2017.; Cindrić 2019.).

Molekularno genetičke metode karakterizacije sorata kakve se masovno danas koriste zasnivaju se na analizi varijabilnosti nasljedne osnove (DNA). Za razliku od tradicionalnih, primjena ovih metoda daje objektivnije rezultate jer isključuje utjecaj vanjskih prilika na genotip i fenotip biljke. Temeljem polimorfizma DNA moguće je identificirati genotipove, analizirati porijeklo i pedigree sorti i prepoznati genetski potencijal nekog genotipa za daljnje oplemenjivanje vinove loze (Cindrić, 2019.).

Otkriće molekularno-genetičkih markera omogućilo je detekciju i praćenje razlika u vidu alelnih varijacija na razini DNA. Prvi su se počeli koristiti biokemijski markeri za identifikaciju sorti (izoenzimi) još 80-ih godina 20.st. Prva uspostavljena molekularna metoda koja koristi marker tehniku pri karakterizaciji je RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata) (Žulj, 2017.). Koristi se pri diferencijaciji genotipova, identifikaciji podloga i sorti te analizi polimorfizma. Adam-Boldon i sur. (2011.) tvrde kako je ova tehnika zbog određenih nedostataka više korištena kod drugih poljoprivrednih kultura nego za vinovu lozu. RAPD tehnika (*Random Amplified Polymorphic DNA*- nasumična amplifikacija polimorfne DNA) je vrlo pouzdana i primjenjiva u karakterizaciji sorata. Jednostavna je, jeftina i brza metoda kojom se identificiraju razlike na molekularnoj razini i detektira polimorfizam. Ova tehnika se bazira na principu lančane reakcije polimerazom (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) koja je usavršena 1983. godine i potaknula je razvoj novih tehnika 90-ih godina prošlog stoljeća, poput spomenute RAPD i AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*- polimorfizam dužine umnoženih markera). Iako PCR zahtjeva stroge eksperimentalne uvjete, tehnički je jedna od najjednosavnijih metoda i time nalazi široku primjenu i danas. AFLP omogućava simultanu analizu većeg broja lokusa odjednom, ali nije pogodna za istraživanje roditeljstva jer je dominantan marker, kao i RAPD. Koristi se ponajviše za otkrivanje genetske sličnosti među sortama i analizu njihovih međusobnih genetskih odnosa. Također, koristi se za analizu varijabilnosti i difirencijaciju klonova iste sorte. Mikrosatelitski markeri SSR (*Simple Sequence Repeats* – metoda mikrosatelita) ili STR (*Short Tandem Repeats*) karakteriziraju germplazmu, a koriste se za identifikaciju sorti, utvrđivanje sinonima i homonima u nazivima sorata te otkrivanje porijekla i genetske povezanosti. Dobivene informacije se objedinjuju u nacionalnim bazama što je izrazito pridonijelo utvrđivanju autohtonog sortimenta diljem svijeta. Koriste se i za genetsko istraživanje populacija, mapiranje genoma i oplemenjivanje vinove loze. Početkom ovog stoljeća uslijed dijelomičnog sekvencioniranja (otrkivanja zapisa) genoma vinove loze otkriveno je tisuće SNP-ova (*Single Nucleotid Polymorphism*- polimorfizam pojedinih nukleotida) i predstavljaju marker tehniku nove generacije koja i se danas intezivno istražuje.

SNP marker označava promjenu samo jedne nukleotidne baze u DNA lancu. Njihova prednost je veća prisutnost u genomu i kodirajućim regijama uz veću vjerojatnost povezanosti sa svojstvom genoma u odnosu na mikrosatelite (Žulj, 2017.; Cindrić 2019.).

2.3 Čimbenici otpornosti na pepelnicu

Biljni genetski izvori vinove loze razvijaju se od strane čovjeka (selekcije, oplemenjivanje) jako dugo i još duže evolucijskim procesima (mutacije, prilagodbe i sl.) što je uzrokovalo veliku genetsku raznolikost. Očuvanje genetskih izvora odnosno održavanje biodiverziteta vrlo je važno kako bi se sačuvali ili potencijalno otkrili novi genetski izvori poželjnih svojstava koji mogu koristiti u oplemenjivačkim programima. Biljnu germplazmu sačinjava sav genetski materijal jedne vrste, sorte ili populacije unutar njih. U oplemenjivačkom smislu germplazma predstavlja ukupni izvor genetskog materijala koji se koristi za razvoj novih kultivara i sorti. Prema tome, jedan od oplemenjivačkih zadataka je očuvanje izvora. Čuvaju se u bankama gena i održavaju u različitim kolekcijama znanstvenih i drugih institucija. Prikupljanje germplazme zahtjeva poznavanje promatrane biljke (vrste), njenog staništa, fenologije, reproduktivnog sustava i slično. Zapisi o dosadašnjim otkrićima i pripadajući podaci nalaze se u katalozima. Izvor informacija o germplazmi vinove loze za oplemenjivačke i istraživačke aktivnosti sadrži baza podataka VIVC (*Data on breeding and genetics*; <https://www.vivc.de/>), (Tablica 2.3.1). Sadrži podatke za preko 23 000 uzoraka selekcioniranih linija i *Vitis* vrsta sa pregledom do sada identificiranih lokusa i njima korelirajućim markerima. (Beljo, 2021.; Cindrić, 2019.; Maul i sur.,2021.).

Poznavanje germplazme važan je korak ka identifikaciji i odabiru ciljanih i poželjnih svojstava vinove loze. Brojni do sada utvrđeni i potencijalno korisni geni nalaze se u divljim *Vitis* vrstama. Ren3 i Run1 lokusi otpornosti na pepelnicu potječu iz sjeverno-američkih *Vitisa*. Gen otpornosti na pepelnicu Run1 pronađen je u nasljednoj osnovi američke vrste *Muscadonia Rotundifolia* koja istovremeno nosi i gen Rpv1 zaslužan za otpornost na plamenjaču. Oplemenjivači danas za križanja mogu koristiti kao roditelje hibridne genotipove i sorte koje nose više rezistentnih gene: Ren1, Ren3, Run1/Rpv1, Rpv3.1, Rpv3.2, Rpv10, Rpv12 (Eibach, Toepfer, 2014.).

Tablica 2.3.1 Tablica lokusa otpornosti na pepelnicu vinove loze (prilagođeno po uzoru na originalni rad) (izvor: https://www.vivc.de/docs/dataonbreeding/20201009_Table%20of%20Loci%20for%20Traits%20in%20Grapevine.pdf)

SIMBOL	KROMOSOM	IZVORNI GENOTIP	VRSTA KOJA NOSI SVOJSTVO	IZVOR
REN1	13	Kishmish vatkana	<i>V. vinifera</i>	Hoffmann et al. (2008)
REN2	14	Illinois 547-1		Dalbo et al. (2001)
REN3	15	Regent		Welter et al. (2007)
		Regent		Welter et al. (2007)
		Regent		Akkurt et al. (2014)
		Regent		Van Heerden et al. (2016)
		-		Zyprian et al. (2017)
		Regent		Zendler et al. (2012)
REN4	18	C166-043	<i>V. romanetii</i>	Riaz et al. (2012)
		C87-41	<i>V. romanetii</i>	Mahanil et al. (2012)
REN5	14	Regale	<i>M. rotundifolia</i>	Blanc et al. (2016)
REN6	9	<i>V. piasezkii</i> (DVIT2027)	<i>V. piasezkii</i>	Pap et al. (2016)
REN7	19	<i>V. piasezkii</i> (DVIT2027)	<i>V. piasezkii</i>	Pap et al. (2017)
REN8	18			Zyprian et al. (2017)
REN9	15	Regent		Zendler et al. (2005)
REN10	2	Seyval blanc		Teh et al. (2013)
	2			
RUN1	12	VRH3082-1-42	<i>M. rotundifolia</i>	Barker et al. (2011)
				Feechan et al. (2013)
RUN2.1	18	Magnolia	<i>M. rotundifolia</i>	Riaz et al. (2011)
RUN2.2	18	Trayshed	<i>M. rotundifolia</i>	Riaz et al. (2011)
SEN1	9	Chardonnay	<i>V. vinifera</i>	Barba et al. (2014)

Iako je cijela *V. vinifera* vrsta osjetljiva na pepelnicu, postoje sorte koje se uzgajaju u Uzbekistanu, u čijem je genomu pronađen otporan gen Ren1 na 13. kromosomu; Kishmsh vatkana i Džandžal kara (Hoffman i sur., 2008.). Geni otpornosti kod američkih vrsta nalaze na drugim kromosomima, što otvara nove mogućnosti hibridizacije sa stvaranjem multilokusne otpornosti (Coleman i sur., 2010.). Regent je jedna od najpoznatijih sorata, pozitivan je primjer objedinjenja otpornosti i kvalitete u jednoj sorti. Nastao je i uzgaja se u Njemačkoj, gdje se prema podacima Njemačkog zavodu za statistiku 2012. godine uzgajao na 2.047 ha, a prema podacima iz 2008. na 2.200 ha površine. (Töpfer i sur., 2011.; <https://www.destatis.de/>). Istraživanjem hibrida 'Red globe' x 'Regent' u uvjetima Južnoafričke republike identificirani su lokusi otpornosti na pepelnicu (Ren3), na 18. kromosomu i na plamenjaču (Rpv3) na 15. kromosomu. Nasljeđeni su od 'Regent' roditelja, a njihovo prisustvo je dokazano dvije sezone (van Heerden i sur., 2014.).

Razlike u osjetljivosti vinove loze na gljivična oboljenja posljedica su nespecifične otpornosti. Križanjem plemenite loze s otpornim sortimentom u prvoj generaciji daje potomke koji sadrže u osvojenoj genetskoj osnovi svojstvo otpornosti, ali zbog visoke prilagodljivosti i različitih sojeva patogena često puta takva monogenetska otpornost opada nakon izvjesnog vremena i dolazi

do njenog „sloma“. Time se pojavila potreba za jačanjem i stabilizacijom svojstva u smislu gomilanja više različitih gena za otpornost po principu piramidizacije. Poligenetska otpornost ima trajnije i snažnije obrambeno djelovanje na širi spektar patogenih sojeva. (Töpfer i sur., 2011.; Grubišić, 2021.). Primjerice, otporna sorta Panonia ima dva gena otpornosti na plamenjaču (Rpv3 i Rpv12) i jedan gen otpornosti na pepelnicu (Ren3). Povratnim križanjima postiže se kvaliteta plemenite loze sa otpornošću *Vitis* vrsta na način da se udio gena *V. vinifera* povećava, a udio loze donora rezistentnosti smanjuje. Panonia, primjerice, ima 90,6% genoma *V. vinifera*, 6,3% genoma sjeverno-američkih vrste i 3,1% *V. amurensis* (Cindrić, 2019.). Ovakav način selekcije gena je moguć primjermom molekularnih markera. Osim mogućnosti identifikacije i pozicioniranja lokusa, moderni molekularni i biotehnički alati uvelike su pridonijeli znanju o interakciji između pepelnice i vinove loze i njenim obrambenim mehanizmima. Markerima identificirani lokusi za kvantitativna svojstva (*Quantitative trait loci*, QTL) pozicioniraju gene otpornosti na pepelnicu i ostale važne bolesti i štetnike na kromosomima vinove loze. Lokus otpornosti na pepelnicu Run1, Ren1 i Ren3 (*Resistance to Erysiphe/Uncinula necator*, Ren/Run) i njihove pozicije prikazani su na mapi.

Čimbenici mehanizma otpornosti biljke na bolesti i štetnike mogu biti aktivni ili pasivni. Aktivni čimbenici aktiviraju se tek kada je vinova loza napadnuta. Ukoliko je reakcija napadača brža nego reakcija vinove loze tada započinje infekcija. Klimatski uvjeti igraju važnu ulogu i o njima ovisi stupanj rezistentnosti križanaca osobito kod gljivičnih oboljenja. Pasivni čimbenici se odnose na izgrađene barijere koje sprječavaju napad štetnika ili razvoj primarne infekcije. Zbog stresora ili drugih okolnosti (prekomjerna gnojidba, nepravilna agrotehnika i dr.) barijere mogu znatno oslabiti. Takve okolnosti patogeni mogu lako iskoristiti, pogotovo ako takvi uvjeti traju duže vremena. Obrambeni mehanizam vinove loze na gljivične bolesti još uvijek nije u potpunosti istražen. Reakcija biljke na napad patogena varira od potpunog imuniteta, odnosno bez ikakvih vidljivih znakova infekcije, do hipersenzitivnosti. Prema većini autora obrambeni sustav se sastoji od dva glavna mehanizma; odgovor preosjetljivosti (*Hypersensitive response*, HR) je sustav obrane biljke od patogena u kojem stanice oko inficiranog mjesta ugibaju i na taj način sprječavaju dalje širenje patogena izazivanjem programirane smrti napadnutih stanica (PCD) ; otpornost staničnih stijenki i membrana na penetraciju spora i razvoj haustorija gljivica (Qiu i sur.,2015.; Cindrić, 2019.; Gluhić, 2008.).

3. Materijali i metode

3.1 Lokacija i vrijeme

Istraživanje otpornosti na pepelnicu pokusnih sjemenjaka gentipa AFZ-VV-15 x 'Graševina' započeto je u svibnju 2022., a trajalo je do rujna 2022. godine. Istraživanje je dio projekta koji se provodi od strane profesora i studenata diplomata Agronomskog fakulteta Zagreb na Vinogradarsko-vinarskom pokušalištu „Jazbina“ na adresi Jazbina 142 (Zagreb, Hrvatska). Istraživanja koja su prethodila ovom radu vezana su uz klasičan postupak križanja, berbu, sjetvu križanaca te poljsku evaluaciju i selekciju biljnog materijala. Odvajanje sjemenki iz bobica nakon berbe grožđa provedeno je u Ampelografskom laboratoriju Pokušališta iste godine. Postupci stratifikacije i naklijavanja sjemenki provedni su u Laboratoriju za grožđe, mošt i vino Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo, na adresi Fakultetsko dobro 3 (Zagreb, Hrvatska) u razdoblju od 4. studenog 2021. do 6. travnja 2022. Površinska sterilizacija sjemenki provedena je 16. i 17. ožujka također u laboratoriju zavoda. Geografske koordinate pokusnog nasada u kojem se provodilo križanje su E 461305 i N 5079696. Plastenik u kojem su prvotno posijani proklijali križanci, nalazi se unutar Pokušališta. Na modificirane vanjske uvjete populacija sjemenjaka je iz plastenika premještena 16. svibnja 2022. Evaluacija je provedena u dva navrata tokom vegetacijske sezone. Prva 16. kolovoza, a druga 13. rujna 2022.

3.2 Biljni materijal (AFZ-VV-15 x 'Graševina')

Populacija sjemenki AFZ-VV-15 stvorena je 2015. godine križanjem sorata 'Grk' × 'Panonia' ('GRP') i 'Dišeća ranina' x 'Panonia' ('DRP') na Pokušalištu Jazbina. Selekcionirano je devet najboljih potomaka odnosno genotipova kod kojih je genetskom analizom utvrđeno prisustvo gena otpornosti na pepelnicu - Ren3 u heterozigotnom obliku, kao i dva gena otpornosti na plamenjaču vinove loze (Rpv3 i Rpv12), (Hapač, 2020.). Genotipovi iz navedenog križanja: 'DRP-1', 'DRP-3', 'DRP-4', 'GRP-15', 'GRP-18', 'GRP-30' i 'GRP-35' odabrani su za ovo istraživanje kao roditeljske biljke jer je kod njih u poljskim uvjetima utvrđena visoka razina otpornosti na gljivične bolesti. Uz navedena svojstva, predmetni genotipovi posjeduju i funkcionalno ženski cvijet što značajno olakšava sam postupak križanja. Pokusni nasad sjemenjaka koji rastu na vlastitom korijenu posađen je 2017. godine. Trsovi su formirani u uzgojni oblik „lepeza“, a razmak sadnje iznosi 2 m između redova i 1 m između trsova unutar reda. Devet navedenih genotipova iz AFZ-VV-15 populacije korišteno je u križanju kao majčinska biljka, a kao očinska biljka (oprašivač) korišten je polen sorte 'Graševina' iz vinograda navedenog Pokušališta.

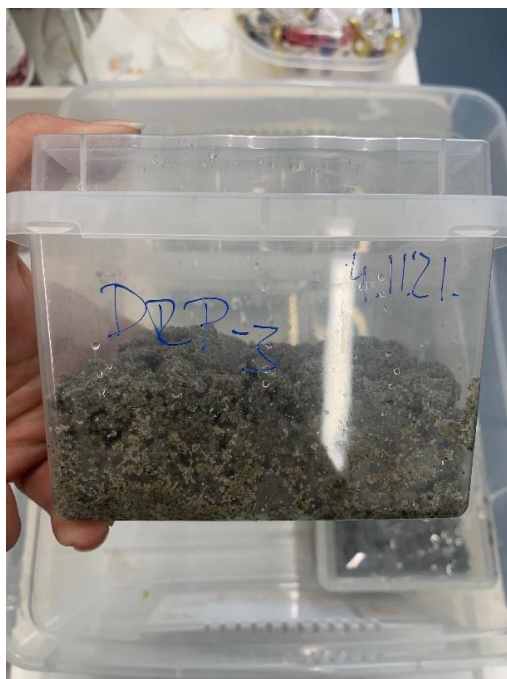
3.3 Postupak križanja, berba i odvajanje sjemenki

Križanje devet genotipa grupa 'DRP' i 'GRP' iz AFZ-VV-15 populacije s Graševinom provedeno je u lipnju 2021. godine na pokušalištu Jazbina. Početkom lipnja, neposredno pred cvatnju majčinske biljke ('GRP' i 'DRP' genotipovi) odabrani su trsovi u polju za buduće križanje, a njihov cvat je izoliran bijelim papirnatim vrećicama. Izolacija cvatova se prakticira u postupku klasičnog oplemenjivanja kako ne bi došlo do spontane stranooplodnje cvata anemofilijom ili entomofilijom u prirodnim uvjetima. Materijal vrećice je prozračan te omogućava protok zraka, a zbog bijele boje se postiže zadovoljavajuća insolacija potrebna cvatu za razvoj. Oprašivanje je provedeno sredinom lipnja 2021. stavljanjem polena Graševine tj. muškog roditelja na tučak majčinskog roditelja iz populacije AFZ-VV-15. Navedena populacija ima morfološki hermafroditan, ali funkcionalno ženski cvijet što uvelike olakšava postupak križanja unutar kojeg je najčešće potrebno provesti emaskulaciju polena kako ne bi došlo do spontane samooplodnje dvospolnih (funkcionalno hermafroditnih) biljaka. Nakon provedenog oprašivanja (po principu „tresući cvat o cvat“), vrećice za izolaciju cvatova ponovno su zatvorene te označene šifrom oplemenjivačkog programa. Krajem lipnja ukonjene su vrećice sa oplođenih cvatova kako bi im se osigurali što bolji uvjeti u fazi dozrijevanja. Trsovi su prekriveni zaštitnom mrežom kako bi se spriječio napad štetočina.

Berba je obavljena sredinom rujna 2021. u fazi fiziološke zrelosti grožđa. Fiziološka zrelost je vrijeme kada su sjemenke u bobama dozrele odnosno potpuno razvijene. Uzorci su zatim odnešeni u Ampelografski laboratorij na postupak odvajanja sjemenke od ostalih dijelova ploda. Odvajanje sjemenki iz endokarpa bobice se primarno obavlja ručno, a potom uz dodatak pektolitičkih enzima. Nakon odvajanja sjemenke su isprane vodom te osušene na papiru pri sobnoj temperaturi. Kada je razina vlage spuštana na odgovarajuću razinu, sjemenke su spremljene u vrećice i skadištene na sobnoj temperaturi do postupka stratifikacije koji je započet nekoliko mjeseci kasnije.

3.4 Stratifikacija

Hladna stratifikacija je obavezan postupak u proizvodnji sjemena. Sjeme se drži u uvjetima koji imitiraju zimske uvjete na otvorenom - hladnoća i visoka vlažnost. Osnovna svrha stratifikacije je prekid primarne dormantnosti sjemena čime se omogućuje njegova klijavost. Isti postupak sjeme može proći i u tlu u prirodnim uvjetima, ali je daleko izloženije potencijalno negativnom djelovanju biotskih štetnika.



Slika 3.4.1 Sjemenke u posudi s pijeskom

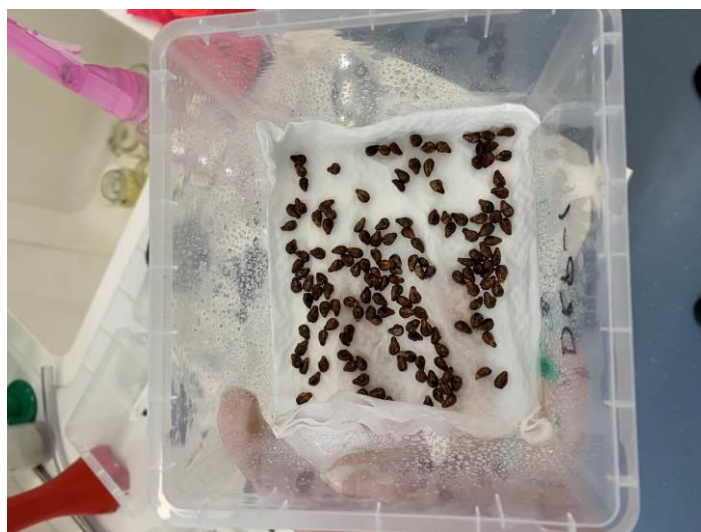
U laboratoriju Zavoda za vinarstvo i vinogradarstvo 04. studenog 2021. godine izvršena je površinska sterilizacija sjemenki 5%-tnom otopinom Izosan® G u trajanju od 15 minuta. Sjeme je isprano destiliranom vodom od ostatka dezinficijensa s površine. Poslagano je u natopljeni pijesak te je skupa pakirano je u Sterivent plastične posude tip S1686 proizvođača Duchefa Biochemie (slika 3.4.1) Naizmjenično je slagan sloj pijeska pa sloj sjemenki po istom uzorku svakih 1 cm do vrha posude. Posude su šifrirane i označene prema sadržaju genotipa unutra. Prekrivene su aluminijskom folijom kako bi se spriječilo isušivanje pijeska, a istovremeno zadržala mogućnost izmjene plinova da se izbjegne pojava anaerobnih uvjeta. Pokusni materijal pohranjen je u hladnjak na temperaturu 4 °C. Tijekom inducirano zimskog mirovanja u trajanju od 132 dana, materijal je povremeno zalijevan vodom kako bi se održala optimalna vlažnost pijeska. Stratifikacija je prekinuta 16. ožujka 2022. vađenjem sjemena iz posuda, sterilizacijom istoga i stavljanjem na daljnji postupak naklijavanja.



Slika 3.4.2 Sjemenke u teglama nakon ispiranja od pijeska i sterilizacije

3.5 Naklijavanje i sjetva

Posude sa sjemenkama su 16. ožujka 2022. izvađene iz komore nakon 132 dana stratifikacije. Od pijeska su ispirane prvo običnom vodom u cjedilu ispod slavine, zatim destiliranom vodom. Premještene su staklenke (slika 3.4.2), prelivene destiliranom vodom u količini dovoljnoj da pokrije sjemenke i pijesak te su poklopljene. Staklenke su stavljene u oscijalijsku mješalicu u trajanju od 6 sati na sobnoj temperaturi kako bi se uz pomoć pijeska očistile od površinskih nečistoća. Sjeme je sutradan ocijeđeno i isprano od destilirane vode i pijeska te stavljeno 30 minuta na sterilizaciju u 200ml 5%-tne otopine Izosan® G. Nakon natapanja, sjeme je ponovo isprano destiliranom vodom te izvagano.



Slika 3.5.1 Sjemenke u pripremi za naklijavanje

Podaci o apsolutnim masama pojedinih genotipova sjemenki i ukupnom broju sjemenki navedeni su u tablici (tablica 4.1.1). Isti dan su sjemenke posložene u devet Sterivent posuda sa navlaženim celuloznim papirom na dnu te su označene prema genotipovima (Slika 3.5.1). Postupak naklijavanja odvijao se u klima komori na temperaturi od 25.6 °C (Slika 3.5.2). Posude s uzorcima prekrivene su tamnom vrećom, a sjemenke su povremeno zalijevane kako bi se održavali povoljni uvjeti za klijanje.



Slika 3.5.2 Uvjeti u klima komori za naklijavanje sjemenki

Prve proklijale sjemenke izvađene su iz komore i posijane u zaštićeni prostor pokušališta Jazbina 23. ožujka, a posljednje 06. travnja 2022. Na isti datum su izvađene i neprokljale sjemenke na kojima su se počeli pojavljivati plijesni. zbog povoljnih uvjeta za njihov razvoj.

Ovisno o dinamici klijanja koja je prikazana na grafu i u tablici, sjemenke su sijane u ukupno sedam termina kroz navedeno razdoblje (Grafikon 4.3.1) Sjeme je posijano u 22 stiroporska kontejnera proizvođača Plastform d.o.o. od kojih svaki ima 40 plitica odnosno sadna mjesta (880 sadnih mjesta ukupno). Kontejner je dimenzije 53 x 31 x 6 cm s volumenom plitice od 78 ml. Ukupna površina kontejnera je 3,6 m², a postavljeni su na potopne stolove u zaštićenom prostoru na otpilike 1 m visine (slika 3.5.3). Posude su napunjene višenamjenskim supstratom Klasmann Substrat2, proizvođača Klasmann-Deilmann. U svako sadno mjesto na dubinu od 1 cm posijano je jedno proklijalo ili dva do tri neprokljalna sjemena te zaliveno vodom do zasićenosti. Biljke su navodnjavane korištenjem potopnog stola svaki dan ujutro i navečer po 5 minuta. U zaštićenim uvjetima plastenika sjemenjaci su rasli do 16. svibnja 2022. kada su premješteni na modificirane poljske uvjete.



Slika 3.5.3 kontejneri na potopnom stolu u zaštićenom prostoru



Slika 3.5.4 Prve izrasle kotiledone sjemenjaka

3.6 Modificirani poljski uvjeti i evaluacija

Biljke su iz plastenika pokušališta premještene su na modificirane poljske uvjete 16. svibnja 2022. Postavljene su na tlo prekriveno PVC materijalom i zaštićene mrežom od tuče. (Slika 3.6.1). Postavljen je sustav za navodnjavanje kišenjem kako bi se osigurala dovoljna količina vlage koja pogoduje razvoju pepelnice. Pokusni prostor je navodnjavan svaki dan ujutro i navečer po 10 minuta. Sklop sjemenjaka u kontejnerima pravilno je raspoređen prema rasporedu 10 dizni kapaciteta 2L/h kako bi dovod vode do svake biljke bio ujednačen.



Slika 3.6.1 Sjemenjaci na dan premještanja iz zaštićenog prostora na modificiranje poljske uvjete



Slika 3.6.2 Sjemenjaci između prve i druge evaluacije

Prva vizualna evaluacija otpornosti sjemenjaka odrađena je 16. kolovoza 2022. i utvrđeno je da se bolest do navedenog datuma nije pojavila. Dana 13. rujna 2022. godine provedena je druga vizualna evaluacija otpornosti sjemenjaka na pepelnicu vinove loze. Za utvrđivanje i ocjenjivanje stupnja zaraženosti odnosno otpornosti korišten OIV deskriptor broj 455 (IPGRI 9.2.3) za stupanj otpornosti lista na *Oidium* (Slika 3.6.3). Razina otpornosti ocjenjena je s pet ocjena na skali od 1 do 9 (OIV, 2009.).

Stupnjevi otpornosti:				
1	3	5	7	9
VEOMA NIZAK	NIZAK	SREDNJI	VISOK	VRLO VISOK ILI POTPUN
Referentne sorte:				
1				9
CARIGNAN N				KOBER 5 BB
Stupnjevi zaraženosti:				
1 = nije ograničeno, opsežne mrlje ili potpuno napadnute liske plojke – jaka fruktifikacija gljivice – izražene i guste nekrotične točkice – vrlo rano otpadanje lišća				
3 = opsežne, neograničene napadnute mrlje – vrlo jaka fruktifikacija – brojne nekrotične točkice – otpadanje lišća (ne toliko rano kao kod prvog stupnja)				
5 = ograničene napadnute mrlje promjera 1-2cm – više ili manje ozbiljna fruktifikacija – nepravilno stvaranje nekrotičnih točkica				
7 = manje napadnute mrlje – slabija fruktifikacija – malo nekrotičnih točkica				
9 = točkasta pojava napada ili potpuno bez simptoma, bez fruktifikacije i nekrotičnih točkica				

Slika 3.6.3 OIV deskriptor 455 za ocjenu otpornosti prema pepelnici; prevedeno po uzoru na originalni rad (Izvor: O.I.V., 2009)



Slika 3.6.4 Različiti stupnjevi zaraze lista

4. Rezultati i rasprava

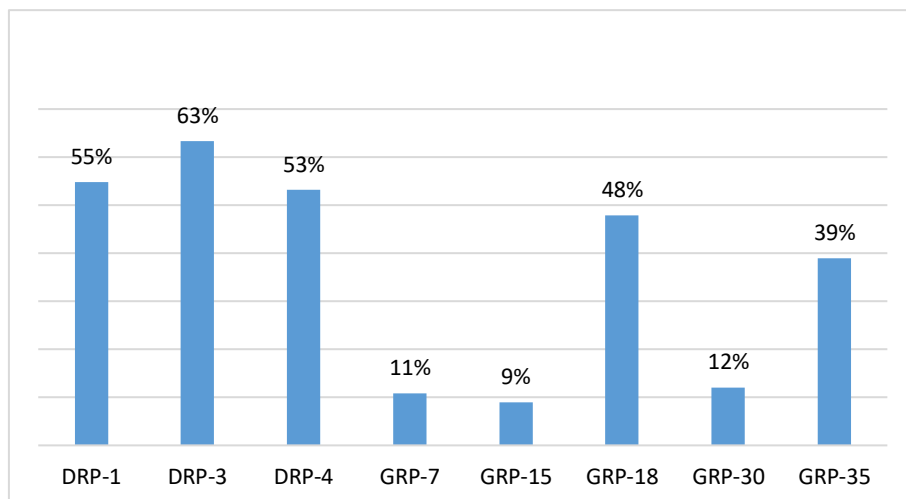
4.1 Količina i klijavost sjemenki dobivenih križanjem

Broj sjemenki pojedinačnih genotipova dobivenih križanjem devet roditeljskih parova značajno se razlikuje. Više je razloga zašto je tome tako, a najvjerojatniji su (ne)pravovremeno nanošenje polena, vrijeme i ispravnost provedbe izolacije cvatova, stupanj rodnosti, inkompatibilnost roditeljskog para itd. Nakon stratifikacije u postupak naklijavanja uključeno je 980 sjemenki apsolutne mase 46,82 g. Roditeljski par 'DRP-3' x 'Graševina' dao je najmanji broj sjemenki, 90 komada mase 4,02 g, a najveći 'GRP-15' x 'Graševina' sa 156 sjemenki i mase 67,49 g. 'GRP-18' x 'Graševina' ima najveću apsolutnu masu sjemenki od 80,34 g, a ukupan broj 142 i time se istaknuo kao genotip s najkrupnijim sjemenkama. Tablica 4.1.1 prikazuje apsolutne mase svih genotipova, ukupan broj sjemenki, broj prokljalih sjemenki, broj neprokljalih sjemenki, postotak prokljalih u ukupnom broju sjemenki stavljenih na naklijavanje, broj živih (izraslih) sjemenjaka te sumu svih parametara.

Tablica 4.1.1 Rezultat križanja AFZ-VV-15 populacije sa Graševinom

GENOTIP X (GRAŠEVINA)	APSOLUTNA MASA (MG)	BROJ SJEMENKI	PROKLJALE SJEMENKE	NEPROKLJALE SJEMENKE	% PROKLJALIH	BROJ ŽIVIH BILJAKA
DRP-1	7343,1	155	85	70	55%	76
DRP-3	4085,7	90	57	33	63%	54
DRP-4	4266,3	111	59	52	53%	59
GRP-7	5089,9	92	10	82	11%	18
GRP-15	6749,1	156	14	142	9%	75
GRP-18	8034,4	142	68	74	48%	81
GRP-30	5885,0	108	13	95	12%	31
GRP-35	5370,5	126	49	77	39%	49
SUMA	46 824,0	980	355	625	36%	443

Genotip 'DRP-3' x 'Graševina' dao je najmanje sjemenki s najmanjom masom, ali istaknuo se najvećim brojem prokljalih sjemenki; od 90 sjemenki koje su stavljene na naklijavanje, prokljalo ih je 57 odnosno 63%, a 33 neprokljale su odbačene iz daljnjeg istraživanja. Obrnuto tome, genotip 'GRP-15' x 'Graševina' koji je dao najviše sjemenki, njih 156 ima daleko najmanju klijavost od 9% što iznosi tek 14 prokljalih sjemenki nakon naklijavanja u komori pod kontroliranim uvjetima.



Grafikon 4.1.1: Klijavost sjemenki

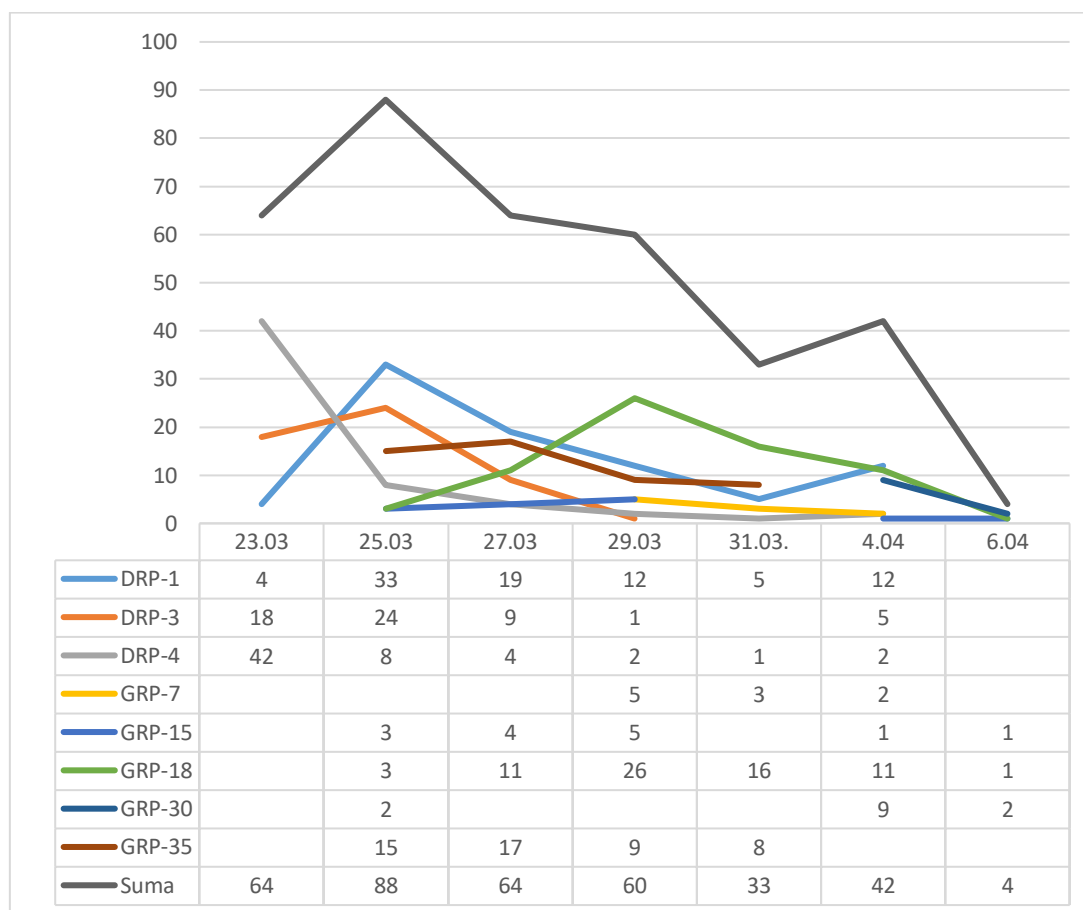
Identičan rezultat od 9% klijavosti za genotip s jednim istim roditeljem kao spomenuti dobila je Grubišić (2021.). Drugi genotip po redu niske klijavosti od 11% je 'GRP-7' x 'Graševina'. Genotip 'DRP-1' x 'Graševina' je drugi prema najvećem broju sjemenki, ali i klijavosti; 155 sjemenki, 55% proklijalih (Grafikon 4.1.1). Usporedbom klijavosti 'DRP' i 'GRP' grupa, očita je bolja klijavosti kod 'DRP' genotipova.

4.2 Dinamika klijanja

Sjemenke križanaca, 980 komada, stavljene na naklijavanje 17. ožujka 2022. proklijavale su u vremenskom intervalu od 23. ožujka do 06. travnja. U tom razdoblju proklijalo je 355 sjemenki, a naknadno u supstratu u kontejneru 88. Navedeno upućuje da 88 sjemenki koje nisu proklijale stratifikacijom do 06. travnja proklijao naknadno u supstratu u kontejnerima smještenim u zaštićeni prostor. Ukupan broj sjemenki određen je brojanjem, a apsolutne mase po genotipovima i sumarna apsolutna masa određena je preciznom vagom u laboratoriju Zavoda za vinarstvo i vinogradarstvo. Godinu ranije, nakon berbe i izolacije sjemenki iz bobica genotipova dobivenih križanjem AFZ-VV-15 x 'Graševina' procijenjen je broj od 1100 sjemenki pomoću relativne mase 50 sjemenki. Apsolutni broj sjemenki koje su upotrebljene u istraživanju je 980. Razlika se pripisuje metodi procjene broja sjemenki pomoću relativne prosječne mase koja u praksi može varirati zbog različitih veličina i masa sjemenki. Također, pretpostavlja se da je jedan dio sjemena od berbe do kraja stratifikacije otpao zbog određenih nedostataka. Tijekom navedenog perioda je isključeno ukupno 355 sjemenki, što označava prosječnu klijavost od 36%. Klijavost se kretala u intervalu od 9% kod najmanje klijavog genotipa 'GRP-15' pa sve do 63% kod genotipa 'DRP-3'. Mogući razlog manjeg postotka klijavosti u usporedbi s klijavostima iz literatura je taj što su na naklijavanje postavljene gotovo sve sjemenke nastale hibridizacijom prethodne godine, uključujući i one koje su isplutale na

površinu tokom flotacijskog testa. Većina autora navodi da plutajuće sjemenke nisu klijave i preporuka je izbaciti ih iz daljnjih postupaka (Eibach i Töpfer, 2015.; Reisch, 2001.). Ipak, ovo istraživanje je pokazalo kako su neke od takvih sjemenki ipak uspjele proklijati, iako se ne može egzaktno procijeniti jesu li se razvile u potpunu biljku i njihov točan broj.

Iščitavajući dobivene podatke iz grafikona i tablice (Grafikon 4.2.1) parametar koji je ujednačen kod svih genotipova a iščitava se iz krivulje sume na grafikonu je pad dinamike klijanja oko 06. travnja kada je proklijalo tek 1,1% sjemenki.



Grafikon 4.2.1 (s tablicom): Dinamika klijanja u vremenskom periodu od 23.03.-6.04.

Taj podatak je, uz vizualno opažanje pojave plijesni, rezultirao odlukom da se prekine postupak naklijavanja. Drugi pregled genotipova na naklijavanju, 25. ožujka, rezultirao je najvećim brojem klijanaca (88 sjemenki) ukupno, i kod genotipova pojedinačno, izuzev 'DRP-4' x 'Graševina' koji je najveću klijavost sa 42 proklijale sjemenke imao 23. ožujka u prvom pregledu naklijavanja. Ujedno, to je i najveći broj proklijalih sjemenki svih genotipova u jednom pregledu. Očituje se jasna razlika u dinamici klijanja među genotipovima, osim krajnjeg datuma kada je kod svih zamijećen pad. Kod nekih je primijećeno duže razdoblje klijanja, kod nekih kraće, no nijedan genotip nije klijaio kroz cijelo promatrano razdoblje. Jasne su razlike u intervalima klijanja, kod nekih genotipova interval klijanja je značajno kraći, kao kod primjetice

'GRP-7' koji je klijaio kroz 5 dana, dok je suprotno tome, 'DRP-1' klijaio kroz duže razdoblje od 13 dana. Ujedno, genotip 'DRP-1' karakterizira, uz najveći broj proklijalih sjemenki, najujednačenija dinamika klijanja, dok 'GRP-7' pokazuje najslabiju dinamiku, uz najkraći interval klijanja, najkasniji početak klijanja i najmanji broj proklijalih sjemenki. Genotipovi grupe 'DRP' pokazali su tendenciju ranijeg proklijavanja od grupe 'GRP'. Dinamika je kod svih neujednačena, uz više ili manje devijacija krivulje, no primijećen je negativan trend klijanja kod svih nakon 29. ožujka. 77% sjemenki je proklijalo u prvih 6 dana između 23. i 29. ožujka, a 33% kroz sljedećih 5 dana od 31. ožujka do 04. travnja. Svi genotipovi izuzev 'DRP-1' i 'DRP-4' imali u razdoblju klijanja kraće ili duže „pauze“. Najduža pauza klijanja, od 15 dana primjećena je kod 'GRP-30'. Gledajući dinamike klijavosti grupa 'DRP' i 'GRP', primjetna je ujednačenija i vremenski duža klijavost grupe 'DRP' (Grafikon 4.2.1), koja je pokazala i značajno bolju klijavost odnosno rezultirala je većim brojem proklijalih sjemenki (tablica 4.1.1).

4.3 Vizualna evaluacija otpornosti na pepelnicu

U ovoj evaluaciji korišten je deskriptor broj OIV-455 za određivanje stupnja otpornosti listova vinove loze na pepelnicu. Evaluacija se provela u dva navrata, 16. kolovoza i 13. rujna 2022. godine. Pepelnica se gotovo uopće nije pojavila u prvom terminu iako je uobičajeno prisutna u ovom području uzgoja. Uzrok tome su djelomično vremenske prilike u vegetacijskoj sezoni koje su bile iznadprosječno sušne i vruće za područje u kojem se istraživanje provodilo. U slučaju slabije pojave gljivičnih oboljenja uobičajena je praksa izvođenje umjetnog inokuluma ili stvaranje što povoljnijih uvjeta za razvoj bolesti. U ovom istraživanju pojava bolesti je manipulirana čestim navodnjavanjem i izloženosti suncu u postavljenim modificiranim poljskim uvjetima rasta.



Slika 4.3.1 Razlika u razini infekcije na listovima jednog sjemenjaka

Od posijanih 980 sjemenki, 13. rujna 2022., nakon druge evaluacije preostalo je ukupno 433 žive biljke, što iznosi 44,2% u uspješnosti uzgoja ulaznog broja sjemenki. 487 ili 55,8% sjemenki

je od sijanja do evaluacije isključeno iz daljnjeg istraživanja jer nisu ostvarile zadovoljavajući rast ili uopće nisu izrasle ili im je lisna površina u potpunosti uništena u ranim fazama rasta zbog nepoznatog razloga, prikazano je u tablici (tablica 4.3.1). Tako je 16 biljaka zbog nedovoljnog rasta ili nedovoljnog broja listova za vizualnu evaluaciju isključeno, broj konačno ocjenjenih biljaka je 427. Kako je unaprijed definirano, individue koje su ostvarile ocjenu 7 ili 9 evaluacijom bit će izdvojene kao genotipovi s potencijalom visoke otpornosti za daljnja istraživanja. Ocjenu 7 (visoka otpornost) ostvarilo je 6 od 427 ispitivanih sjemenjaka, dok najvišu ocjenu otpornosti 9 (potpuna otpornost) nije ostvario niti jedan sjemenjak (tablica 4.3.1).

Tablica 4.3.1 Ocjene genotipova prema OIV deskriptoru 455 za list

Genotip/Ocjena	1	3	5	7	9	uk.br.sjemenjaka	Nerazvijene
DRP-1	10	56	4	2	-	72	4
DRP-3	18	28	4	1	-	51	3
DRP-4	19	33	3	2	-	57	2
GRP-7	6	11	1	-	-	18	
GRP-15	19	36	18	1	-	74	1
GRP-18	41	29	8	-	-	78	3
GRP-30	8	15	7	-	-	30	1
GRP-35	21	24	2	-	-	47	2
Suma	142	232	47	6	-	427	16
Ocjene (%)	34%	54%	11%	1%	0%	100%	

Dakle, 1% sjemenjaka od ukupne količine posijanih sjemenki iskoristit će se u budućim ispitivanjima otpornosti te uzgojnih i proizvodnih karakteristika u poljskim uvjetima, a 99% ih se odbacuje, što se smatra zadovoljavajućim rezultatom predmetnog istraživanja. Sjemenjaci visoke otpornosti su, pretpostavljeno, naslijedili gen od interesa Ren3. Prema tome, roditeljski parovi 'DRP-1' x 'Graševina' i 'DRP-4' x 'Graševina' dali su po dva visoko otporna genotipa, a 'DRP-3' x 'Graševina' i 'GRP-15' x 'Graševina' po jedan sjemenjak. Od ukupno šest visoko otpornih sjemenjaka pet pripada 'DRP' grupi. Zaključuje se da je naslijeđena otpornost na pepelnicu jača i/ili postojanija kod potomaka Dićeše ranine nego kod Grka. Ocjena 1 znači vrlo niska otpornost, a takvih biljaka je 34%. Ocjenu 3 (srednja otpornost) dobilo je više od polovine tj. 54% sjemenjaka. Generalno, dobiven je zadovoljavajući broj genotipova sa visokom fenotipskom otpornošću prema pepelnici vinove loze koji će koristiti u daljnjim fazama ovog oplemenjivačkog programa, a rezultati genetskih analiza će pokazati uspješnost provedene hibridizacije i dati smjernice za buduće korake.

5. Zaključak

Ispitivanje i ocjena otpornosti populacije sjemenjaka (AFZ-VV-15 x 'Graševina') na pepelnicu uspješno je provedena na pokušalištu Jazbina. Istraživanje je dio oplemenjivačkog programa Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu koji se provodi od 2015. godine u svrhu oplemenjivanja i ispitivanja svojstava dobivenih kultivara u procesu stvaranja otpornih sorti prilagođenih na lokalne uvjete rasta.

Hibridizacijom je dobiveno 980 sjemenki što je zadovoljavajući broj za potrebe ispitivanja otpornosti. Postupci odvajanja sjemena, stratifikacije i otklanjanja dormantnosti te naklijavanja također su provedeni uspješno u laboratoriju Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo. Sposobnost klijanja razlikuje se među genotipovima te iznosi od 9% do 63%, a prosječna klijavost populacije je 36%. Nakon sjetve broj živih biljaka koje ulaze u daljnje postupke ispitivanja otpornosti je 443, a broj biljaka za konačnu evaluaciju je 427 što predstavlja dovoljno velik uzorak za predmetno istraživanje.

Evaluacija prema OIV deskriptoru 455 te je dala zadovoljavajuće rezultate. Generacija (AFZ-VV-15 x 'Graševina') pokazala je srednju otpornost na napad pepelnice, a 1% tj. 6 od 427 genotipova izdvojilo se kao visoko otporno. Najbolji genotipovi koristit će se u daljnjim istraživanjima i aktivnostima unutar oplemenjivačkog programa. Krajnji cilj svih oplemenjivačkih programa, pa tako i ovog je utjecati na smanjenje korištenja kemijskih sredstava za zaštitu bilja štetnih po okoliš i ljudsko zdravlje, a s druge strane zadržati konačni proizvod – vino na razini kvalitete na kakvu su potrošači navikli.

6. Popis literature

1. Adam-Blondon A. F., Delrot S., Poni S., Rossi V., Serrano E., Töpfer R., Torres- Vinals M., Belle-Boix E. (2014). Combining innovation in vineyard management and genetic diversity for a sustainable European viticulture. Abstracts Book of the 11th International Conference on Grape Breeding and Genetics Yangling. Beijing
2. Adam-Blondon A. F., Martínez-Zapater J.M., Kole C. (2011). Genetics, Genomics, and Breeding of Grapes. CRC Press. Clemson, SC, USA.
3. Alvarez G., Ceballo F. C., Quinteiro C. (2009). The role of inbreeding in the extinction of a European royal dynasty. Plos One
4. Andabaka Ž., Filaković K., Preiner D., Stupić D., Marković Z., Maletić E., Tomaz I. (2021). Ampelografska evaluacija klonskih kandidata sorte 'Graševina bijela' (*Vitis vinifera* L.) u uvjetima vinogorja Zagreb. Glasnik Zaštite Bilja. 44(5), 34-38.
5. Beljo J. (2012). Tehnike oplemenjivanja bilja. Sveučilište u Zadru
6. Cindrić P., Korać N., Ivanišević D. (2019). Ampelografija i selekcija vinove loze. Univerzitet u Novom Sadu. Poljoprivredni fakultet. Donat graf. Beograd
7. Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement. The basic concepts. Euphytica 142, 169–196.
8. Cvjetković B. (2010). Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze. Zrinski d.d. Čakovec
9. Eibach R., Töpfer R. (2015). Traditional grapevine breeding techniques. Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry. Cambridge
10. Gluhic D., Karlic D. (2008). Interspecifični križanci vinove loze – osnove selekcijskog rada. Stručni rad, Glasnik zaštite bilja, izdanje 6.
11. Grubišić A. (2020). Otpornost sjemenjaka nastalih križanjem sorata vinove loze 'Grk' i 'Panonia' na plamenjaču vinove loze. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
12. Grubišić V. (2021). Otpornost sjemenjaka nastalih križanjem ('Grk' × 'Panonia') × 'SK 00-1/8' na plamenjaču vinove loze. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
13. Hapač K. (2020). Primjena molekularnih markera u detekciji gena za otpornost na plamenjaču i pepelnicu vinove loze. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
14. Hoffmann S., Di Gaspero G., Kovacs L., Howard S., Kiss E., Galbacs Z., Testolin R., Kozma P. (2008). Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. Theor Appl Genet 116, 427–438.
15. Hrgović Štir M. (2018). Posebnosti novostvorenih sorata vinove loze (*V. vinifera* L.) tolerantnih na gljivične bolesti. Diplomski rad, Sveučilište u Osijeku, Fakultet biotehničkih znanosti
16. Ivanišević D., Di Gaspero G., Korać N., Foria S., Cindrić P. (2014). Grapevine genotypes with combined downy and powdery mildew resistance. International Conference on Grapevine Breeding and Genetics.

17. Karoglan Kontić J. (2014). Sorte vinove loze otporne na gljivične bolesti. *Gospodarski list*. 17, 39 – 49.
18. Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2008). *Vinova loza: ampelografija, ekologija, oplemenjivanje*. Školska knjiga. Zagreb
19. Maul E. (2011). Domestication of Grapevine viewed in Fast Motion. *Internationale Rebveredlertagung*. Institut fuer Reben-züchtung und Rebenveredlung Geisenheim.
20. Mirošević N. (2007). *Razmnožavanje loze i lozno rasadničarstvo*. Golden marketing - Tehnička knjiga. Zagreb
21. Montarry J., Cartolaro P., Delmotte F., Jolivet J., Willocquet L. (2008). Genetic Structure and Aggressiveness of *Erysiphe necator* Populations during Grapevine Powdery Mildew Epidemics. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(20), 6327-6332
22. Nikolić D. (2012). *Oplemenjivanje vinove loze*. FLEŠ-Zemun. Beograd
23. O.I.V. (2009). *Descriptor list for grape varieties and Vitis species (2nd edition)*. International Organisation of Vine and Wine. Dedon. Paris.
24. Pejić I., Maletić E. (2013). Istraživanje genetskih resursa vinove loze na području rudine (Psunj). *Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi*, 175-185.
25. Qiu W., Feechan A., Dry I. (2015). Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Hortic Res* 2, 15020.
26. Robinson J., Harding J., Vouillamoz J. (2012). *Wine grapes-A complete guide to 1,368 vine varieties, including their origins and flavours*. Penguin Books. London
27. Štambuk P., Karoglan Kontić J. (2021). Razvoj sorata otpornih na uzorčnike bolesti – važan korak ka smanjenju uporabe fungicida. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za vinogradarstvo i Vinarstvo , Znanstveni centar izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja, *Glasilo biljne zaštite* 3(21).
28. Šubić M. (2013). Pepelnica vinove loze (*Erysiphe necator* Schwein.) - dominantan problem u zdravstvenoj zaštiti Međimurskih vinograda. *Glasnik Zaštite Bilja*. 13(6), 442-453.
29. Šubić M. (2021). Suzbijanje pepelnice vinove loze u ozračju novih trendova i smanjenja uporabe pesticida. *Glasnik Zaštite Bilja*, 21(3), 376-373.
30. Töpfer R., Hausmann H., Harst M., Maul E., Zyprian E., Eibach R. (2011). New horizons for grapevine breeding. *Methods in temperate fruit breeding. Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology*. 5, 79–100.
31. van Heerden C.J., Burger P., Vermeulen A. i sur. (2014). Detection of downy and powdery mildew resistance QTL in a 'Regent' × 'RedGlobe' population. *Euphytica* 200, 281–295
32. Žulj Mihaljević M. (2017). *Analiza genetske strukture i srodstva hrvatskih autohtonih sorti vinove loze*. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet

Popis korištenih poveznica:

1. <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/S1686/name/sterivent-high-container-107-x-94-x-96-mm> (pristupljeno: 18.03.2022.)
2. <https://geoportal.dgu.hr> (pristupljeno: 18.03.2022.)
3. <https://planthouse.hr/stratifikacija-sjemena/> (pristupljeno: 18.03.2022.)
4. <https://www.plastform.hr/presadnice-proizvodi.php> (pristupljeno: 18.03.2022.)
5. <http://euro-brod.hr/ponuda/hortikultura/klasmann-deilmann-ponuda-proizvoda/gotovi-profesionalni-supstrati-proizvod1> (pristupljeno: 18.03.2022.)
6. https://en.wikipedia.org/wiki/Uncinula_necator (pristupljeno: 10.09.2022.)
7. <https://pinova.hr/pepelnica-vinove-loze/> (pristupljeno: 15.09.2022.)
8. <https://www.agroklub.com/vinogradarstvo/nativo-folicur-falcon-suzbijanje-pepelnice-u-vinogradu/3070/> (pristupljeno: 15.09.2022.)
9. <http://www.hort.cornell.edu/reisch/grapegenetics/breeding/crossing1.html> - u tekstu (Reisch, 2001.), (pristupljeno 20.09.2022.)
10. <https://www.vivc.de/index.php?r=loci%2Findex> (pristupljeno 20.09.2022.)
11. https://www.vivc.de/docs/dataonbreeding/20201009_Table%20of%20Loci%20for%20Traits%20in%20Grapevine.pdf (pristupljeno 21.09.2022.)
12. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_03_32_641.html (pristupljeno 23.09.2022.)
13. <https://www.apprrr.hr/registri/> (pristupljeno 25.09.2022.)
14. <https://www.destatis.de/EN/Home/node.html;jsessionid=16C283BC19B9054A31566263141D4D1F.live711> (pristupljeno 25.09.2022.)
15. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32009L0128> (pristupljeno 25.09.2022.)