

Utjecaj sanitarnog statusa i podrijetla eksplantata na rast i razvoj 'Plavca malog' i 'Pošipa' in vitro

Šišak, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:204:498326>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-16**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Utjecaj sanitarnog statusa i podrijetla eksplantata na
rast i razvoj 'Plavca malog' i 'Pošipa' *in vitro***

DIPLOMSKI RAD

Ana Šišak

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Hortikultura – Vinogradarstvo i vinarstvo

**Utjecaj sanitarnog statusa i podrijetla eksplantata na
rast i razvoj 'Plavca malog' i 'Pošipa' *in vitro***

DIPLOMSKI RAD

Ana Šišak

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Zvezdana Marković

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ana Šišak**, JMBAG 0178113939, rođen/a 2.11.1998. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Utjecaj sanitarnog statusa i podrijetla eksplantata na rast i razvoj 'Plavca malog' i 'Pošipa'
in vitro

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Ane Šišak**, JMBAG 0178113939, naslova

Utjecaj sanitarnog statusa i podrijetla eksplantata na rast i razvoj 'Plavca malog' i 'Pošipa'

in vitro

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Izv. prof. dr. sc. Zvezdana Marković mentor _____
2. Izv. prof. dr. sc. Darko Vončina član _____
3. Izv. prof. dr. sc. Darko Preiner član _____

Zahvala

Ovom prilikom želim zahvaliti svim ljudima koji su me podržavali tijekom mog životnog obrazovanja, mojoj obitelji, bakama i djedu, a posebno svojim roditeljima, mami Sanji i tati Zdenku koji su bili puni razumijevanja i strpljenja. Također, želim zahvaliti svojim bliskim prijateljima, Antoniji, Ana-Mariji, Kristini, Ivi, Tini, Katarini, Lei, Lauri i Moniki te mojim sestričnima Giti i Karmen koje su slušale sva moja zanovjetanja i probleme tijekom studiranja, a pružali mi potporu onda kada mi je najviše trebala te me gurali da već jednom krenem u pisanje diplomskog rada.

Velika hvala ide mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Zvezdani Marković koja me prvo vodila kroz završni rad, upoznala me sa još jednom granom vinogradarstva i učinila dodatne dvije godine zanimljivijim. Također, što je prihvatila mentorstvo i u diplomskom radi, bila strpljiva i puna razumijevanja tijekom izvođenja pokusa te i u mojoj dugoj izradi diplomskog rada. Hvala Vam na stručnom, profesionalnom i prijateljskom pristupu! Veliko hvala i svim profesorima Agronomskog fakulteta koji su me tijekom svih ovih 5 godina studiranja vodili konačnom cilju, a posebna zahvala profesorima Zavoda za Vinogradarstvo i vinarstvo što su cijeloj mojoj generaciji, a i meni olakšali studiranje uz zabavnije metode učenja.

„Last but not least, I wanna thank me for believing in me, I wanna thank me for doing all this hard work, I wanna thank me for having no days off, I wanna thank me for... for never quitting, I wanna thank me for always being a giver and tryna give more than I receive, I wanna thank me for tryna do more right than wrong, I wanna thank me for just being me at all times...Ana, GOOD JOB!“

Sadržaj

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Uvod | 1 |
| 1.1. | Cilj istraživanja | 2 |
| 2. | Pregled literature | 3 |
| 2.1. | <i>In vitro</i> kultura..... | 3 |
| 2.2. | Bolesti vinove loze | 5 |
| 2.2.1. | Virus lepezastog lista vinove loze (GFLV) | 7 |
| 2.2.2. | Virusi iz skupine uvijenost lista vinove loze (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3) | 8 |
| 2.2.3. | Virusi iz skupine naboranost drveta vinove loze (GVA, GVB)..... | 9 |
| 3. | Materijali i metode..... | 11 |
| 3.1. | Biljni materijal..... | 11 |
| 3.1.1. | Sorta 'Plavac mali' | 12 |
| 3.1.2. | Sorta 'Pošip bijeli' | 13 |
| 3.2. | Sterilizacija materijala..... | 14 |
| 3.3. | Hranidbena podloga | 15 |
| 3.4. | Metode kultura meristema i aksilarnog pupanja..... | 16 |
| 3.5. | Provedba pokusa | 18 |
| 4. | Rezultati i rasprava..... | 21 |
| 4.1. | Utjecaj klona sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' na rast i razvoj eksplantata <i>in vitro</i> | 21 |
| 4.2. | Utjecaj kategorije pupa na rast i razvoj eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' <i>in vitro</i> | 22 |
| 4.3. | Utjecaj sanitarnog statusa na rast i razvoj eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' <i>in vitro</i> | 26 |
| 5. | Zaključak | 27 |
| 6. | Dodaci | 28 |
| 6.1. | Popis skraćenica u tekstu..... | 28 |
| 7. | Popis literature..... | 29 |
| 8. | Životopis | 31 |

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ane Šišak**, naslova

Utjecaj sanitarnog statusa i podrijetla eksplantata na rast i razvoj 'Plavca malog' i 'Pošipa' *in vitro*

U Republici Hrvatskoj zabilježen je visok udio zaraženih nasada autohtonih sorata vinove loze pri čemu zaraze virusima predstavljaju najveći problem. Pomoću *in vitro* metoda provodi se postupak oslobađanja vinove loze od virusa. Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj sanitarnog statusa kod klonova predmetnih sorata na rast i razvoj eksplantata. Klonovi sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' različitog sanitarnog statusa s obzirom na zaraženost virusima (GVA, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-1+GLRaV-3) uvedeni su u kulturu tkiva korištenjem različite kategorije pupova sa zeljastih mladica (a - apikalni meristem, b - 2. i 3. pup na početnom izdanku i c - 4. i 5. pup na početnom izdanku) te su pomoću metode kulture meristema inokulirani na medij (MS+0,5 mg/L BAP + 0.05 mg/l IAA). Rast i razvoj eksplantata u kulturi tkiva mjereno je nakon četiri i osam tjedana kultivacije. Rezultati pokazuju signifikantan utjecaj sorte u rastu i razvoju eksplantata *in vitro*, dok sanitarni status klonova unutar sorata te kategorija pupova nisu signifikantno utjecali na mjerene parametre visine, broja nodija i pojave kalusa, osim što je kategorija pupa signifikantno utjecala na stvaranje kalusnog tkiva. Dobivene rezultate potrebno je nadopuniti sa daljnjim istraživanjima ovdje testiranih sorata.

Ključne riječi: vinova loza, *in vitro*, klon, sanitarni status, kategorija pupa

Summary

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

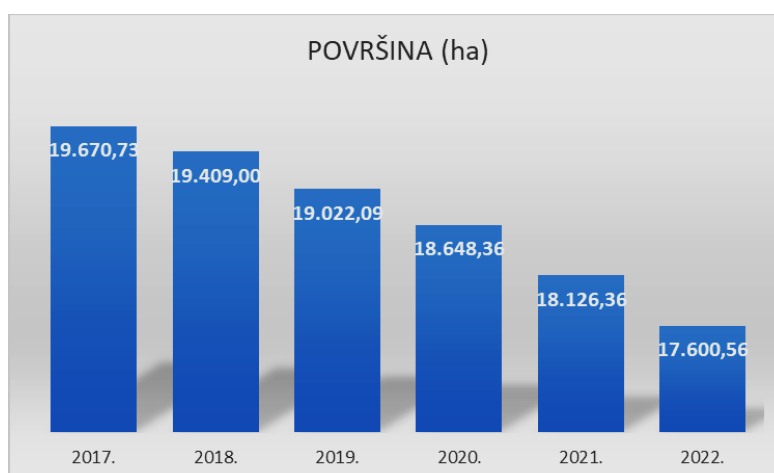
Influence of the sanitary status and origin of the explants on the growth and development of 'Plavac mali' and 'Pošip' *in vitro*

In the Republic of Croatia, a high percentage of infected vineyards of autochthonous grapevine varieties has been recorded, with virus infections representing the biggest problem. Using *in vitro* methods, the process of freeing the vine from the virus is carried out. With this research, the aim was to determine the impact of the sanitary status of clones of varieties "Plavac mali" and "Pošip" on the growth and development of explants. Clones of the varieties "Plavac mali" and "Pošip" with different sanitary statuses in terms of virus infections (GVA, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-1+GLRaV-3) were introduced into tissue culture using different categories of buds from the initial shoots (a - apical meristem, b - 2nd and 3rd bud on the initial shoot, and c - 4th and 5th bud on the initial shoot), and they were inoculated onto a medium (MS+0.5 mg/L BAP + 0.05 mg/l IAA) using the meristem culture method. The growth and development of explants in tissue culture were measured after four and eight weeks of cultivation. The results show a significant impact of the variety on the *in vitro* growth and development of explants, while the sanitary status of clones within the varieties and the categories of buds did not significantly affect the measured parameters of height, number of nodes, and the occurrence of calluses, except that the bud category significantly influenced the formation of callus tissue. Further research is needed to complement the obtained results regarding the tested varieties.

Keywords: grapevine, *in vitro*, clone, sanitary status, bud category

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) značajna je kultura u gotovo svim dijelovima svijeta. Prema prvim zapisima, povijest uzgoja i proizvodnje vinove loze seže iz 5000-5400 g.pr.Kr. uz istočnu obalu Crnog mora na području tadašnje Transkavkazije (područja današnjeg Irana) otkud se proširila prvo na dijelove Europe pa kasnije i na ostale dijelove svijeta (Maletić i sur. 2008.). Za njezino širenje zaslužni su Grci koji su grčkom kolonizacijom prenijeli kulturu uzgoja vinove loze na Mediteran, a potom su Rimljani tijekom vremena Rimskog carstva unaprijedili sam uzgoj i proizvodnju vina, ali i transport u druge krajeve. Sredinom 19. stoljeća, takozvano zlatno doba vinogradarstva, u mnogim krajevima Europe, pa tako i na područjima Hrvatske, dolazi do pojave filoksere (*Daktulospharia vitifoliae*, trsna uš) što dovodi do propadanja većine vinograda (Maletić i sur. 2008.). Do razloga propadanja korijena dolazi radi pojave nodoziteta i tuberoziteta prilikom uboda filoksere, te do sekundarnih infekcija putem otvorenih rana koje predstavljaju ulaz za ostale štetnike. Rješenje problema pronađeno je u tehnici cjepljenja europske vinove loze na podloge američkih vrsta vinove loze (Mirošević i Karoglan Kontić 2008.). Američke vrste vinove loze tijekom dugogodišnjeg suživota s filokserom stvorile su obrambeni mehanizam i postale su otporne na filokseru. Naime, nakon napada filoksere kod mjesta uboda počinje se stvarati plutasto staničje koje predstavlja nepropusnu barijeru za ulazak mikroorganizama i ostalih patogena te ne dolazi do sekundarnih infekcija i konačnog propadanja trsa. Uvođenjem tehnike cijepljenja za suzbijanje filoksere i uporaba fungicida na bazi bakra i sumpora za suzbijanje plamenjače (*Plasmopara viticola*) i pepelnice (*Erysiphe necator*) počinje obnova vinograda u Europi (Mirošević i Kontić 2008.). U Hrvatskoj vinogradarstvo ponovo dobiva veliki značaj krajem 20. stoljeća. Površine pod vinogradima tada su iznosile oko 62 000 ha. Danas su površine znatno manje te se smanjuju iz godinu u godinu. Prema najnovijim podacima Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju (APPRRR) ukupna površina pod vinogradima u Republici Hrvatskoj za 2022. godinu iznosila je 17.600,56 ha.



Graf 1.1. Površine pod vinogradima u Republici Hrvatskoj u periodu od 2017. - 2022. godine
(izvor: A. Šišak)

Jedan od najvažnijih problema s kojima se suočava današnje vinogradarstvo predstavljaju napadi štetnika i zaraze bolestima od kojih su posebno značajne one koje se prenose vegetativnim razmnožavanjem, a među njima virusi imaju glavnu ulogu. Nažalost, trenutno ne postoji rješenje suzbijanja virusnih bolesti, već se koriste preventivne mjere pomoću kojih možemo usporiti njihovo širenje i smanjiti gospodarske štete. Do danas je poznato da vinovu lozu može zaraziti preko 80 virusa, no većina ih se smatra manje ekonomski značajnima (Vončina 2021.). Prema tim podacima, vinova loza se ubraja u drvenaste kulture s najvećim brojem poznatih viroza. Korištenje necertificiranog, zaraženog sadnog materijala dovodi do povećanja stupnja zaraženosti virusima u proizvodnim nasadima. Dolazi do velikih gospodarskih gubitaka, skraćuje se vijek vinograda, ugrožava se opstanak zaraženih trsova te znatno utječe na kvalitetu vina. Pošto je vinova loza jedna od najznačajnijih uzgojnih drvenastih kultura širom svijeta unazad pedesetak godina velika pažnja pridaje se metodama za detekciju virusa (biološka i vizualna detekcija, serološke metode i PCR metode) i stvaranju certificiranog sadnog materijala te biotehnološkim metodama u svrhu oslobađanja biljkaka od virusa (*virus-free* biljke) pomoću *in vitro* metoda kao što je kultura meristema (Jelaska 1994.)

1.1. Cilj istraživanja

Cilj rada je utvrditi utjecaj zaraze ekonomski značajnim virusima (GLRaV-1, GLRaV-3, GFLV i GVA) i podrijetla eksplantata, odnosno kategorije pupa (a - apikalni. b - 2. i 3. pup i c - 4. i 5. pup) na rast i razvoj klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' u kulturi meristema *in vitro*.

2. Pregled literature

2.1. *In vitro* kultura

Primjena tehnika kulture biljnog tkiva u rješavanju poljoprivrednih problema drastično se povećala u posljednjih pedesetak godina. Štoviše, postala je sastavni dio oplemenjivanja poljoprivrednih, hortikulturnih i drvenastih biljaka, kao i važan dio biljne biotehnologije (Jelaska 1994.). Temelji se na stvaranju novih biljaka iz pojedinačnih stanica pod kontroliranim uvjetima na krutim ili tekućim podlogama na temelju svojstva totipotentnosti. Velika prednost *in vitro* razmnožavanja je u dobivanju velikog broja zdravih biljaka u vrlo kratkom roku s malim udjelom ulaznog materijala. Iz tog razloga, *in vitro* kultura savršeno je oruđe za dobivanje biljaka bez virusa i ostalih patogena te u očuvanju zdravih matičnih biljaka.

Povijest primjene kulture tkiva seže iz 1902. godine kada je znanstvenik Haberlandt pokušao komadiće biljnog tkiva prenijeti na hranidbenu podlogu, no radi neuspješnog izbora materijala, neadekvatne hranidbene podloge i raznih kontaminacija pokušaj je bio neuspješan. Tek je 1934. godine znanstvenik White prvi uspješno kultivirao korijen rajčice (Jelaska 1994.). Sve do danas kultura biljnog tkiva se usavršavala te zahvaljujući raznim znanstvenim radovima unazad nekoliko desetljeća tehnika kulture tkiva postala je važna grana u biljnoj biotehnologiji. Uspješna kultivacija tkiva u *in vitro* uvjetima ovisi o nekoliko čimbenika kao što su genotip biljke, dob i zdravstveno stanje biljke, izbor i sastav hranidbene podloge te sterilnost tijekom procesa subkultivacije u *in vitro* laboratoriju. Regeneracija biljke biti će uspješnija ako se izabere dobar genotip, a eksplantati budu zdravi, mladi i neodrvljeni (Jelaska 1994.). Iako postoje različite hranidbene podloge, danas se najviše koristi tzv. MS medij (Murashige i Skoog medij) jer se pokazao kao najadekvatniji medij za većinu kultura koje se koriste *in vitro* (Park 2021.)

Vinova loza jedna je od biljaka koja se može podvrgnuti gotovo svim tehnikama kulture biljnoga tkiva. Morel je 1941. godine prvi povrgnuo vinovu lozu kulturi tkiva, dok se 1952. godine po prvi put koristila kultura meristema za dobivanje biljaka oslobođenih od virusa (Marković i sur. 2021.). Kako je u posljednje vrijeme u vinogradarskim regijama povećana zaraza od ekonomski značajnih virusa, a otkrivaju se i novi virusi, većina istraživanja bazira se na oslobađanju biljaka od virusa. Kultura meristema i termoterapija najčešće su korištene metode za dobivanje bezvirusne vinove loze, no njihova kombinacija percipira se kao najuspješnija metoda (Milkus i sur. 2000.; Skiada i sur. 2009.). Kultura meristema oslanja se na činjenicu kako su virusi obično isključeni iz meristematskog tkiva radi neprestanog dijeljenja stanica koje virus ne stigne inficirati (Kassanis 1957.; Turcsan i sur. 2020.) Korisnost termoterapije (37,2 °C) i *in vitro* kulture meristema za dobivanje bezvirusnih biljaka vinove loze utvrdili su Dřaz-Barrita i sur. (2008.) u istraživanju na sorti 'Chancellor'. Sorta je bila zaražena virusom uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 1 (GLRaV-1) i uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3). Zaraženi eksplantati uneseni su u *in vitro* kulturu na ½ MS medij s dodatkom od 0,5 mg/L 6-benzilaminopurina (BAP) te su povrgnuti

termoterapiji određeni broj dana. Nakon toga preživjeli apikalni meristemi subkultivirani su na novi medij i ostavljeni da regeneriraju. Potom su povrgnuti RT-PCR i ELISA testovima gdje se ustanovilo da su biljke povrgnute termoterapiji i kulturi meristema 100% *virus-free* biljke.

Također, i u Republici Hrvatskoj aktivno se provode postupci *in vitro* oslobađanja vinove loze od virusa. U znanstvenom istraživanju (Marković i sur. 2014.), objavljeno u časopisu Central European Journal of Biology u kojem sudjeluje i Agronomski fakultet u Zagrebu, proučavao se utjecaj zdravstvenog stanja osam gospodarski važnih hrvatskih sorata i njihova reakcija na uvođenje u *in vitro* kulturu uspoređujući reakcije zdravih i virusom zaraženih genotipova pojedine sorte (GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-3+GVA i GLRaV-1+GLRaV-3). Nodijski eksplantati inokulirani su na tri različite podloge (M1 - ½ MS medij, M2 - MS medij, M3 – MS medij s dodatkom 4.4 µM/L benzilaminopurina (BAP)) te je praćeno preživljavanje nakon 2 tjedna i ponovan rast nakon 8 tjedana. Zabilježen je značajno veći broj nodija i prosječna duljina internodija na M2 mediju, dok je na M3 mediju zabilježena značajno kraća prosječna duljina internodija. Postotak preživjelih eksplantata zdravog genotipa i pet zaraženih genotipova sorte 'Plavac mali' bilo je 97,5% i 82,8-87,5%, a kod ponovnog rasta zdravi genotip dosegao je 95,5%, dok je postotak zaraženih genotipova pao na 5,5-31,4% ovisno o kojem se virusu radilo. Istraživanje je predstavilo prvu uspješnu *in vitro* introdukciju za tri od osam proučavanih autohtonih hrvatskih sorata.

Godinu kasnije, Hančević i sur. (2015.) objavljuju istraživanje u kojem su pomoću kombinacije kulture meristema i termoterapije eliminira dva ekonomski značajna virusa na klonskim kandidatima sorte 'Plavac mali'. Postupak je bio uspješan za eliminaciju uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3) i virusa pjegavosti vinove loze (GFkV). Rezultati su pokazali kako je došlo do selektivne eradikacije virusa ovisno o početnom sastavu virusne populacije obrađenih uzoraka. Uspoređujući *in vitro* rast eksplantata utvrđeno je kako proliferacija tkiva također ovisi o sastavu virusa. Isto tako utvrđen je veliki utjecaj genotipa na uspješnost eliminacije virusa u *in vitro* uvjetima. Ovo istraživanje je prvi izvještaj eliminacije virusa na sorti 'Plavac mali'.

2021. godine objavljeno je istraživanje (Marković i sur. 2021.) u kojem se testirala *in vitro* metoda kulture meristema na 18 autohtonih sorata s različitim zarazama i mogućnosti eliminacije GLRaV-3 pomoću iste metode. Biljni materijal uzrokovan je u vinogradu u dvije fenološke faze, prije i nakon cvatnje vinove loze. Apikalni meristemi (1 mm) stavljeni su na MS medij s dodatkom 0,5 mg/L benziladenina (BA) i 0,05 mg/L indol-3-octene kiseline (IAA) te je praćen njihov rast i razvoj. Kod većine ispitanih sorata, veća je uspješnost onih meristema koji su uzorkovani nakon cvatnje, s iznimkom jedne sorte. Genotipovi zaraženi s više virusa pokazali su bolje rezultate *in vitro* od onih genotipova zaraženih s jednim ili dva virusa. Rezultati su pokazali uspješnu eliminaciju GLRaV-3 kod jedne sorte i uspješnu uspostavu *in vitro* kulture metodom kulture meristema, ali i da sorta i faza rasta imaju značajan utjecaj na uspjeh *in vitro* kulture. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja za primjenu ovog protokola za eliminaciju virusa kod ostalih autohtonih sorata.

U novije vrijeme radi se na dodatnim metodama za dobivanje bezvirusnih biljaka. Jedna od tih metoda je metoda somatske embriogeneze. U novijem istraživanju (Malenica i sur. 2020.) somatska embriogeneza koristila se kao metoda za eliminaciju virusa iz značajnih hrvatskih sorata i za stvaranje pouzdanog izvora zdravih biljaka. Metoda se pokazala uspješnom za eliminaciju inicijalno otkrivenih virusa, uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 1 i 3 (GLRaV-1 i GLRaV-3), virusa pjegavosti vinove loze (GFkV) i virusa lepezastog lista vinove loze (GFLV) na sortama 'Plavac mali' i 'Babica' s uspjehom eliminacije od najmanje 30 % što ukazuje na potencijal metode za proizvodnju ukorijenjenih sadnica bez virusa za značajne sorte ili superiorne klonove istih sorata i za uspostavu stalnog izvora certificiranog bezvirusnog sadnog materijala.

2.2. Virusi vinove loze

Prema definiciji virusima se nazivaju mali obligatni intracelularni paraziti, koji sadrže ili RNA ili DNA genom okružen zaštitnim proteinskim omotačem (Gelderblom 1996.). Mogu se pronaći u svim živućim organizmima i biljkama. Jedna od odlika virusa je vrlo brzo širenje u samom organizmu ili biljci što vrlo često rezultira konačnim propadanjem. Biljne viroze i virozama slične bolesti u svijetu vinogradarstva predstavljaju jedan od važnijih problema (Maletić i sur. 2008.). Zaražene trsove vrlo je teško izliječiti, a biljka postaje trajni izvor zaraze. Virusi se pomoću vektora vrlo brzo šire unutar i između nasada, a simptomi se javljaju tek kasnije kada je virus već udomaćen u biljku. Također, prenose se i na potomstvo preko vegetativnog razmnožavanja. Vinova loza kao vrsta koja se kroz cijelu svoju povijest širila vegetativnim razmnožavanjem predstavlja pogodnu kulturu za napad virusa. Trenutno je više od 86 različitih vrsta virusa detektirano na vinovoj lozi te se iz tog razloga, uspoređujući s ostalim uzgojnim vrstama voćnih kultura, vinova loza svrstava kao jedan od najvećih domaćina virusa (Vončina 2021.). Ipak samo nekoliko ih se smatra ekonomski značajnim.

Radi svoje raširenosti, načina širenja i potencijalne štete unutar vinograda (smanjenje prinosa i kvalitete grožđa, sam vijek trajanja vinograda te povećanje osjetljivosti na ostale bolesti) u ekonomski značajne viruse svrstavaju se virusi iz skupine infektivne degeneracije, skupine uvijenost lista vinove loze i oni virusi iz skupine naboranost drveta vinove loze (Tablica 2.2.1.). U Republici Hrvatskoj prema Vončini i sur. (2012.) najzastupljeniji virus je virus iz skupine uvijenosti lista vinove loze (GLRaV). U Kontinentalnoj regiji dominantan je virus uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 1 (GLRaV-1), dok je u Priobalju dominantan uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3) (Vončina i sur. 2012.).

Tablica 2.2.1. Ekonomski značajni virusi vinove loze

| SKUPINA VIRUSA | KRATICA | ENGLESKI NAZIV | HRVATSKI NAZIV |
|-------------------------------|----------------|---------------------------------------|--|
| Infektivna degeneracija | GFLV | Grapevine fanleaf virus | Virus lepezastog lista vinove loze |
| | ArMV | Arabis mosaic virus | Virus mozaika gušarke |
| Uvijenost lista vinove loze | GLRaV-1 | Grapevine leafroll-associated virus 1 | Uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 1 |
| | GLRaV-2 | Grapevine leafroll-associated virus 2 | Uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 2 |
| | GLRaV-3 | Grapevine leafroll-associated virus 3 | Uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 3 |
| Naboranost drveta vinove loze | GVA | Grapevine virus A | A-virus vinove loze |
| | GVB | Grapevine virus B | B-virus vinove loze |

Prema brojnim istraživanjima unazad nekoliko godina (Vigne i sur. 2004.; Engel i sur. 2010.; Vončina i sur. 2011.) u vinovoj lozi detektirane su mješovite infekcije. Također, infekcije su sve učestalije i postotak zaraženih trsova u vinogradima raste. Istraživanje koje su proveli Vončina i sur. (2011.) pokazalo je da je došlo do pogoršanja zdravstvenog stanja hrvatskih autohtonih kultivara. Tijekom veljače 2009. godine na dvije lokacije (Nacionalna kolekcija hrvatskih autohtonih kultivara vinove loze na Znanstveno-nastavnom pokušalištu Jazbina u Zagrebu i mjesto Risika na otoku Krku) odabrano je 95 trsova koji su testirani na prisustvo ekonomski značajnih virusa (Tablica 2.2.1.). GLRaV-3 uspostavio se kao dominantan virus u čak 78,9% trsova, dok su ostali virusi također nađeni u visokim postocima. Isto tako, pronađene su miješovite infekcije. Na lokaciji Nacionalne zbirke najčešće infekcije bile su GLRaV-3 + BDV (15,8%) i GLRaV-1 + GLRaV-3 + BDV (14,7%), dok na lokaciji Risika dominirale su infekcije s GLRaV-3 + GVA (10,5%). Samo je 17 trsova sveukupno bilo bez virusa. Istraživanje je ukazalo na problematiku sanitarnog statusa trsova te ukazuje na potrebu za proizvodnjom certificiranog bezvirusnog sadnog materijala kao jednu od preventivnih metoda u usporavanju širenja virusa. Također nedavna istraživanja (Vončina i sur. 2019.; Andabaka i sur. 2021.; Vončina i sur. 2022.) ukazuju na sve veći postotak detekcije ekonomski značajnih virusa kod autohtonih sorta Republike Hrvatske koje su uključene u klonsku selekciju ili su već dio Nacionalne kolekcije hrvatskih autohtonih sorata. Istraživanja ukazuju na problematiku održavanja zdravog sadnog materijala i na nužnost obnove i provedbe nove klonske i sanitarne selekcije.

Prema istraživanju Čarija i sur. (2022.) utvrđena je prisutnost ekonomski važnih virusa u testiranim trsovima sorte 'Plavac mali' metodom lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR). Utvrđene su mješovite zaraze, od kojeg je virus GLRaV-3 najzastupljeniji u 85,71 % testiranih trsova. Istraživanje ukazuje na visok postotak zaraženosti virusom pa je potrebno provesti eliminaciju virusa za dobivanje zdravog sadnog materija kod najvažnije hrvatske autohtone crne sorte.

Suzbijanje virusa i smanjenje njegovog širenja moguće je pomoću preventivnih mjera, a naglasak se stavlja na korištenje od virusa slobodnog (*virus-free*) sadnog materijala te na suzbijanju vektora virusa. Također, u novije vrijeme radi se na ozdravljanju zaraženih biljaka pomoću biotehnoloških metoda kao što je kultura meristema u *in vitro* kulturi.

2.2.1. Virus lepezastog lista vinove loze (GFLV)

Virus lepezastog lista vinove loze jedan je od najstarijih virusa vinove loze. Spada u porodicu *Secoviridae* i u rod *Nepovirus*, a karakterizira ga jednolančana RNA. Prvi opis simptoma bolesti napravljen je 1865. godine (Cazalis-Allut 1865.), a potom i više od 1000 radova tijekom niza godina koji ga opisuju. Simptomi se mogu primijetiti na listovima, rozgvi i grozdovima. Ovisno o kojem soju virusa se radi, simptomi mogu biti deformirajuće ili kromatogene prirode (Martelli i Boudon-Padieu 2006.). Bolest je dobila naziv po lepezastom izgledu lista kojeg napadaju deformirajući sojevi virusa. Listovi su naborani i asimetrični, s izrazito skupljenim žilama, rub lista je narezan, a glavni sinus peteljke je razvučen (Ivić i Fazanić 2011.). Kod rozgve javljaju se skraćeni internodiji, nepotpuno odrvenjavanje, nepravilnosti u grananju, a neke zaražene sorte odlikuje „cik-cak“ rast internodija (Meng i sur. 2017.) (slika 2.2.1.1.). Grozdovi su nepravilnog oblika, manji i malobrojniji, kao i bobice unutar grozda, te dolazi do pojave neredovitog sazrijevanja (slika 2.2.1.1.). Kod zaraze kromatogenim sojevima karakterističan je žuti mozaik na lišću. Na lišću se pojavljuju svijetložute mrlje (slika 2.2.1.1.). Simptomi žućenja čitavih trsova ili klorotičnog mozaika na listovima najuočljiviji su u proljeće, dok s povećanjem temperatura tijekom ljetnog razdoblja postanu neprimjetni (Ivić i Fazanić 2011.). Virus se prenosi pomoću zaraženog sadnog materijala ili pomoću vektora. Virus lepezastog lista vinove loze prenosi američka kopljasta nematoda (*Xiphinema index*) koja se pomoću stileta kojeg zabada u korijen vinove loze tijekom ishrane prenosi virus.



Slika 2.2.1.1. Simptomi zaraze virusom lepezastog lista vinove loze

(izvor: https://www.researchgate.net/figure/Grapevine-fanleaf-virus-symptoms-on-grapvines-in-Iran-A-and-B-double-node-black_fig1_276963173 („cik-cak“ rast), Ivić i Fazanić 2011. (grozd, list))

2.2.2. Virusi iz skupine uvijenost lista vinove loze (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3)

Virusi iz skupine uvijenost lista vinove loze najrasprostranjeniji su virusi vinove loze u vinogradarskim regijama svijeta (Martelli i Boudon-Padieu 2006.) Pripadaju porodici *Closteroviridae* i rodovima *Closterovirus* (virus GLRaV-2) i *Ampelovirus* (virusi GLRaV-1 i GLRaV-3). Prvi opisi datiraju iz 19. stoljeća kada se na trsovima pojavila fenološka promjena crvenila lišća. Ekonomski najznačajnijima iz ove skupine smatraju se virusi uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 1, 2 i 3. Naziv bolesti dobilo je po specifičnom uvijanju lisne plojke prema dolje i stvaranju crvenih mrlja kod crnih sorata ili žutih mrlja kod bijelih sorata (slika 2.2.2.1.). Mrlje se sve više šire te kasnije u jesen zahvaćaju cijelu plojku lista koja postaje crvena ili žuta, dok područje uz žile ostaje zeleno (Vončina 2021.). Plojka postaje deblja i lomljiva radi nakupljanja škroba u degeneriranim kloroplastima. Simptomi u vidu promjene boje i uvijenosti listova isprva se javljaju na najstarijem lišću pri bazi mladica (Ivić i Fazinić 2011.). Uvijanje lista smanjuje asimilacijsku površinu lista što utječe na fiziološke procese unutar trsa (translokacija ugljikohidrata) te smanjenje količine šećera (GLRaV-3) i sam aromatski profil mošta, kvalitetu grožđa i prinosa (GLRaV-1). Također, virusi ove skupine mogu imati negativan utjecaj na sposobnost ukorjenjivanja, primitak podloge i plemke i loše srašćivanje (GLRaV-2) (Vončina 2021.). Simptomi se mogu manifestirati i na grozdovima u obliku smanjenja bobica i veličine grozda te neravnomjernog dozrijevanja (slika 2.2.2.1.). Skraćuje se vegetacijski period biljke i takva neishranjena odlazi u zimski period što može dovesti do smrzavanja biljke prilikom jakih zima. Na američkim lozama i njihovim križancima, koji se koriste kao podloge, zaraza virusima

uzročnicima uvijenosti lista uglavnom je latentna, odnosno ne dolazi do pojave simptoma (Ivić i Fazinić 2011.). Virusi iz ove skupine prenose se zaraženim sadnim materijalom ili štitastim ušima. Točni vektori znaju se samo za viruse uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 1, 3, 5 i 9. Štitaste uši prenose virus na semiperzistentan način, odnosno potreban je kratak period ishrane štitaste uši na zaraženoj biljci kako bi ona postala infektivna, a potom kratak period na zdravoj biljci kako bi se virus prenio. U Republici Hrvatskoj virusi iz skupine uvijenost lista vinove loze, pogotovo GLRaV-1 i GLRaV-3, zastupljeniji su od virusa infektivne degeneracije (Vončina 2021.). Isto tako, ovi virusi mogu se pronaći i kao miješovite infekcije s ostalim ekonomski značajnim virusima.



Slika 2.2.2.1. Simptomi virusa iz skupine uvijenost lista vinove loze
(izvor: Meng i sur. 2017. (lišće), Ivić i Fazanić 2011. (grozd))

2.2.3. Virusi iz skupine naboranost drveta vinove loze (GVA, GVB)

Virusi iz skupine naboranost drveta spadaju u porodicu *Betaflexiviridae* i u rod *Vitivirus*. Bolest je prvi put detektirana 1961. godine u južnoj Italiji (Granit i Ciccarone 1961.) Iz ove skupine ekonomski značajni virusi su A-virus vinove loze (GVA) i B-virus vinove loze (GVB). Simptomi su teško uočljivi, varijabilni i javljaju se samo kod cijepova, dok je kod europske loze na vlastitom korijenu, američkih vrsta roda *Vitis* sp. i hibrida najčešće dolazi latentna zaraza. Jedan od simptoma zaraze GVA i GVB je zadebljanje na mjestu cijepjenja podloge i plemke (slika 2.2.3.1.). No, specifični simptomi zaraze mogu se uočiti na središnjem cilindru ispod kore drveta kao što su udubljenja, jamice ili brazde (Ivić i Fazinić 2011.). Jačina manifestacije simptoma ovisi o klimatskim uvjetima i kombinaciji podloge i plemke (Vončina 2021.). Ipak kod zaraženim biljaka dolazi do smanjenja vigora, kasnije kretanje u vegetaciju, a mogu utjecati i na značajan pad prinosa. A-virus vinove loze (GVA) uzrokuje pojavu naboranost drveta podloge Kober (slika 2.2.3.1.), dok B-virus vinove loze (GVB) uzrokuje plutavost kore vinove loze kod podloga *Vitis rupestris* i LN33, a uz simptom plutavosti kore kod podloge LN33 javlja se i uvijenost i crvenilo lišća. Vektori oba virusa su štitaste uši, a način zaraze je semiperzistentan. Također, kao i kod ostalih skupina virusa, ovi virusi najčešće dolaze u obliku miješovite infekcije.



Slika 2.2.3.1. Simptomi virusa iz skupine naboranost drveta vinove loze
(izvor:Ivić i Fazanić 2011. (slika desno), Meng i sur. 2017. (slika lijevo))

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

Agronomski fakultet u suradnji s ostalim suradnicima u razdoblju od 2019. do 2022. godine proveo je podizanje osnovnog matičnog nasada sa svim registriranim klonovima na znanstveno-nastavnom pokušalištu Jazbina u sklopu projekta 'Novi početak za stare Hrvatske sorte vinove loze'. Prije podizanja nasada, registrirani klonovi prošli su kroz dugotrajan postupak individualne klonske selekcije. Jedan od ciljeva klonske selekcije u navedenom projektu bilo je dobivanje kvalitetnog i selekcioniranog sadnog materijala pošto u Republici Hrvatskoj postoji problem u iskorištavanju autohtonih sorata radi manjka zdravog sadnog materijala. Do sada je kroz postupak selekcije prošlo 11 sorata, a registrirano je 34 klona (Preiner i sur. 2022.).

Istraživanje je provedeno na po jednoj klonskoj liniji sorata 'Plavac mali' i 'Pošip'. Klonske linije prikupljene su u Nacionalnoj kolekciji autohtonih sorata na znanstveno-nastavnom pokušalištu Jazbina. Obje sorte prošle su kroz individualnu klonsku selekciju iz koje su odabrani najbolji klonovi na temelju unutar-sortne varijabilnosti. Klonovi su testirani serološkom metodom detekcije virusa, odnosno metodom ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), s kojom je utvrđena prisutnost ekonomski štetnih virusa u pojedinačnim trsovima određenih klonova koji su izdvojeni kao bezvirusni, a kod kojih je došlo do reinfekcije. Sanitarni status ispitivanih klonova naveden je u Tablici 3.1.1.

Tablica 3.1.1. Sanitarni status biljnog materijala

| SORTA | KLON I BROJ TRSA | SANITARNI STATUS |
|---------------|------------------|-------------------|
| 'Plavac mali' | PMC19-13 | Bez virusa |
| | PMC19-2 | GLRaV-1 |
| | PMC19-15 | GFLV |
| 'Pošip' | POŠ068 | Bez virusa |
| | POŠ068-4 | GVA |
| | POŠ089-11 | GLRaV-1 + GLRaV-3 |

Kod sorte 'Plavac mali' uočena je velika varijabilnost pa se sorta povrgnula individualnoj klonskoj selekciji koju je predvodio Agronomski fakultet, Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo te su izdvojeni i priznati oni klonovi koji su se isticali u gospodarsko važnim svojstvima. U ovom istraživanju korišten je jedan klon sorte 'Plavac mali' sa različitim sanitarnim statusima (VF, GFLV i GLRaV-1) i dva klona sorte 'Pošip' (jedan VF i sa GVA zarazom te drugi sa kombiniranom zarazom GLRaV-1 +

GLRaV-3) (Tablica 3.1.1.) Klonovi su uzeti sa znanstveno-nastavnog pokušališta Jazbina koje spada pod vlasništvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu.

3.1.1. Sorta 'Plavac mali'

Sorta 'Plavac mali' autohtona je sorta Republike Hrvatske dobivena križanjem sorata 'Crljenak kaštelanski' (Zinfandel, Primitivo) x 'Dobričić' (Maletić i sur. 2004.). Oduvijek se smatrala autohtonom sortom, što je i potvrđeno genetičkim istraživanjem pomoću SSR markera (Maletić i sur. 2018.). U prirodi sorta se može raspoznati po malo povinutim, paučnasto dlakavim vršcima mladica koji su sivo zelene boje s rubnim crvenilom na mladim listićima (Mirošević i Turković 2003.). Odrasli listovi su srednje veličine, tamnozelenog i mjehurastog lica, svjetlijeg i vunasto dlakavog naličja, peterodijelni te često preklopljeni sa sinusima u obliku lire ili slova "U". Peteljka je tamnozeleno boje s izraženim crvenkasto - ljubičastim preljevom. Grozd je malen do srednje velik, srednje zbijen, piramidalan, najčešće s jednim krilcem (Maletić i sur. 2018.). Bobice unutar grozda su srednje velike, okrugle s karakterističnom tamnoplavo-crnom bojom kože koja je prekrivena maškom. Zrele bobice mekog su i sočnog mesa. Često se može pronaći nejednolika obojenost bobica i neujednačeno dozrijevanje.



Slika 3.1.1.1. Sorta 'Plavac mali'

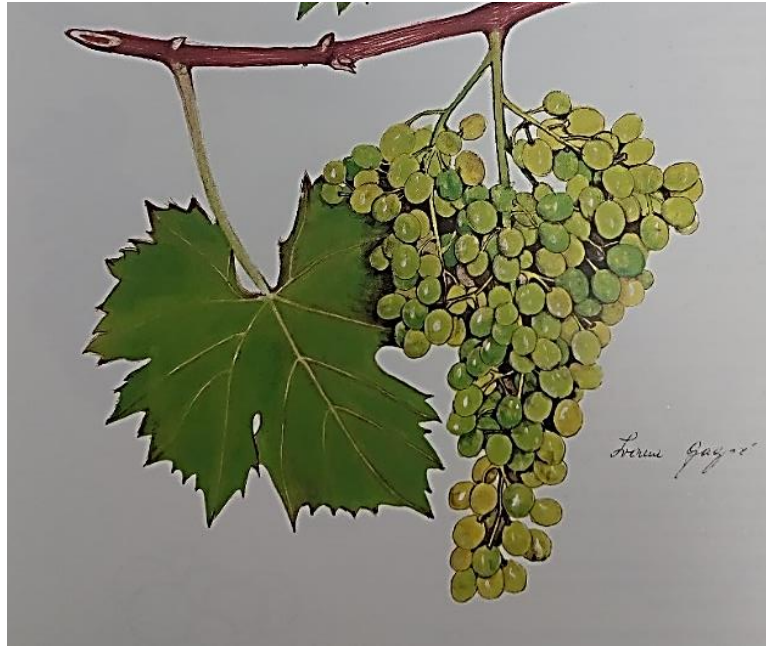
(izvor: Ampelografski atlas)

Prema podacima 'Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju', sorta 'Plavac mali' svrstava se na treće mjesto najzastupljenijih sorata s površinom uzgoja na 1 333,73 ha, odmah iza sorata 'Graševina' i 'Malvazija Istarska'. S velikom uzgojnom površinom i uzlaznom trendu uzgoja i sadnje novih trsova, sorta spada u kategoriju najmanje ugroženih sorata Republike Hrvatske (Maletić i sur. 2018.). Karakteristike kao što su manja osjetljivost na gljivične bolesti, dobra i redovita rodnosti te mali uzgojni zahtjevi čini ovu sortu vrlo popularnom u podregijama Srednja i Južna Dalmacija, osobito na otocima Brač, Hvar i Korčula te na poluotoku Pelješac gdje pokazuje najbolje kvalitete. Sorti pogoduju propusna tla s izrazito južnim ekspozicijama te tipičnom mediteranskom klimom (Mirošević i Turković 2003.). Iako u tim uvjetima prinosi niži, aromatski profil grožđa i obojenost doprinose proizvodnji vrhunskih vina. Također, sorta se može iskoristiti i u proizvodnji prošeka (Maletić i sur. 2018.).

3.1.2. Sorta 'Pošip bijeli'

Sorta 'Pošip bijeli' ili 'Pošipica' autohtona je sorta Republike Hrvatske nastala na otoku Korčuli gdje se i dan danas najviše uzgaja. Nastala je spontanom križanjem sorata 'Bratkovina bijela' x 'Zlutarice blatske bijele', odnosno s dvije autohtone Korčulanske sorte, što se i dokazalo pomoću molekularnih markera. Iako se najviše uzgaja na otoku Korčuli, može se pronaći i na susjednim otocima te se polako širi i u ostale dalmatinske vinograde (Maletić i sur. 2018.). To dokazuju i najnoviji podaci 'Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju' koji sortu Pošip bijeli svrstavaju kao 10. najzastupljeniju sortu Republike Hrvatske s uzgojem na 329,47 ha.

Vrh mladice je svijetlozelene boje, gol i povijen je u obliku udice. Također, mladica je isto gola, bez dlaka, žljebasta i tamnije boje na osunčanoj strani. Odrasli listovi su veliki i srcoliki, mogu biti trodijelni ili peterodijelni sa sinusima u obliku slova "U" ili "V". Lice i naličje također golo, svjetlozelene boje s izraženim i šiljastim zupcima. Grozd je srednje velik do velik, rastresit i piramidalnog oblika s najčešće dva duga sukrilca. Bobice su srednje velike, jajolike, a pri vrhu šiljaste. Upravo radi njihovog oblika sorta je dobila ime 'Pošip', pošto bobica liči na "šip", odnosno vrh od krampa ili maškline (Maletić i sur. 2018.). Kožica je zelenožute do zlatnožute boje, tanka, poluprozirna i obilno posuta maškom, dok se meso karakterizira kao slatko i sočno, specifične užitne sortne arome što ju čini i kao dobru zobaticu (Mirošević i Turković 2003.).



Slika 3.1.2.1. Sorta 'Pošip bijeli'

(izvor: Ampelografski atlas)

3.2. Sterilizacija materijala

Sterilizacija biljnih eksplantata važan je korak u *in vitro* laboratorijskim postupcima. Sterilizacija sprječava kontaminaciju mikroorganizmima i osigurava rast zdravih biljaka. Postupak sterilizacije sastoji se od nekoliko koraka. Na početku se eksplantati temeljito operu tekućom vodom kako bi se odstranile površinske prljavštine. Potom se režu na eksplantate veličine otprilike 1-2 cm i odstranjuju se svi oštećeni dijelovi. Zatim se eksplantati uranjaju u 70% otopinu etanola nekoiko sekundi te u otopinu natrijevog-hipoklorita (NaClO) 20 minuta. Na kraju se eksplantati ispiru tri puta sterilnom vodom kako bi se odstranila otopina. Eksplantati se potom režu na odgovarajuće veličine ovisno o vrsti istraživanja. Cijeli postupak sterilizacije odvija se u sterilnim uvjetima (komora sa sterilnim protokom zraka) te sa odgovarajućim sterilnim instrumentima (Jelaska, 1994.). Važno je održavati sterilne uvjete tijekom cijelog procesa pripreme eksplantata, sterilizacije i pokretanja kulture kako bi se spriječila kontaminacija i osigurao uspješan *in vitro* rast biljaka.

3.3. Hranidbena podloga

Iako postoje različite vrste hranidbenih podloga, svaka podloga za uspješnu subkultivaciju i konačnu regeneraciju biljaka mora u sebi sadržavati makro- i mikroelemente (u obliku mineralnih soli), izvor ugljika (obično je to šećer saharoza), organske dodatke (vitamini i aminokiseline) te regulatore rasta. Danas se najviše koristi tzv. MS podloga (Murashige i Skoog medij) nazvana po znanstvenicima koji su je prvi put upotrijebili 1962. godine, a koja se pokazala kao najuniverzalnija hranidbena podloga za većinu kultura koja se koriste u *in vitro* razmnožavanju (Murashige i Skoog 1962.).

Tablica 3.3.1. Sastav MS hranidbene podloge

| Chemical | Formula | Concentration |
|-------------------------------------|---|---------------------|
| Macronutrients (10 X) | | |
| Ammonium nitrate | NH_4NO_3 | 16.5 |
| Potassium nitrate | KNO_3 | 19.0 |
| Calcium chloride | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 4.4 |
| Magnesium sulfate | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 3.7 |
| Potassium dihydrogen orthophosphate | KH_2PO_4 | 1.7 |
| Micronutrients (100 X) | | |
| Manganese sulphate | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 2.23 |
| Zinc sulphate | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.86 |
| Potassium iodide | KI | 0.086 |
| Cupric sulphate | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.0026 |
| Sodium molybdate | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| Cobalt (ous) chloride | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.0026 |
| Boric acid | H_3BO_3 | 0.62 |
| Vitamin source (100 X) | | |
| Nicotinic acid | $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ | 0.05 |
| Thiamine hydrochloride | $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$ | 0.01 |
| Pyridoxine hydrochloride | $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ | 0.05 |
| Glycine | $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ | 0.2 |
| Iron source (100 X) | | |
| Sodium EDTA | $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ | 2.78 |
| Ferrous sulphate | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 3.72 |
| Myo-inositol | | 0.1 g (freshly add) |
| Sucrose | $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_3$ | 30 g |
| Phytigel | | 2 g |

(izvor: Esfandiari 2015.)

Za uspjeh *in vitro* kulture jedan od glavnih parametara predstavlja hranidbena podloga. Vrlo je važno izabrati pogodnu hranidbenu podlogu na kojoj se eksplantati dobro razvijaju kako bi se dobila dovoljna količina podataka. Za uspostavu *in vitro* kulture u ovom istraživanju koristio se B inicijalni medij čiji je sastav isti kao i kod standardnog MS medija uz dodatak 0,05 mg/L indolactene kiseline (IAA), 0,5 mg/L 6-benzilaminopurina (BAP) i 1 mg/L plant preservative mixture (PPM) odnosno fungicida za sprečavanje kontaminacija. Zbog neujednačenog rasta i razvoja eksplantata te stvaranja kalusa (slika 3.3.1.) na pojedinim klonovima sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' eksplantati su subkultivirani na standardnu MS hranidbenu podlogu bez dodatka hormona rasta.

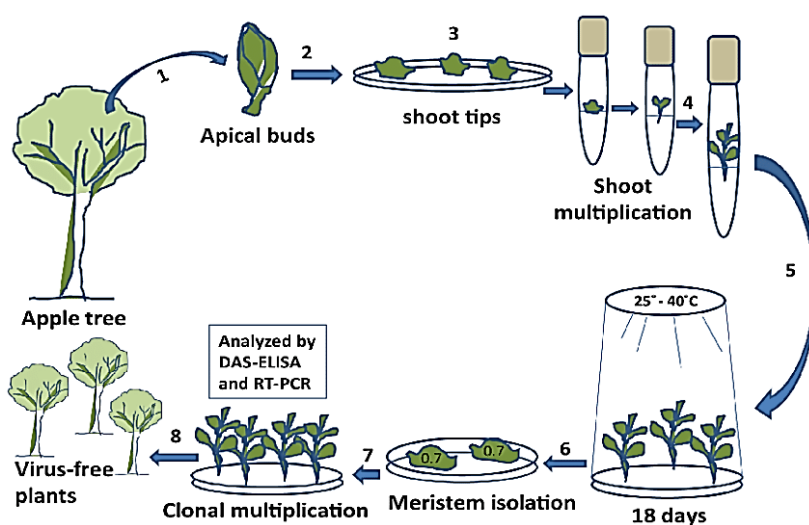


Slika 3.3.1. Stvaranje kalusa na eksplantatima

(izvor: A. Šišak)

3.4. Metode kultura meristema i aksilarnog pupanja

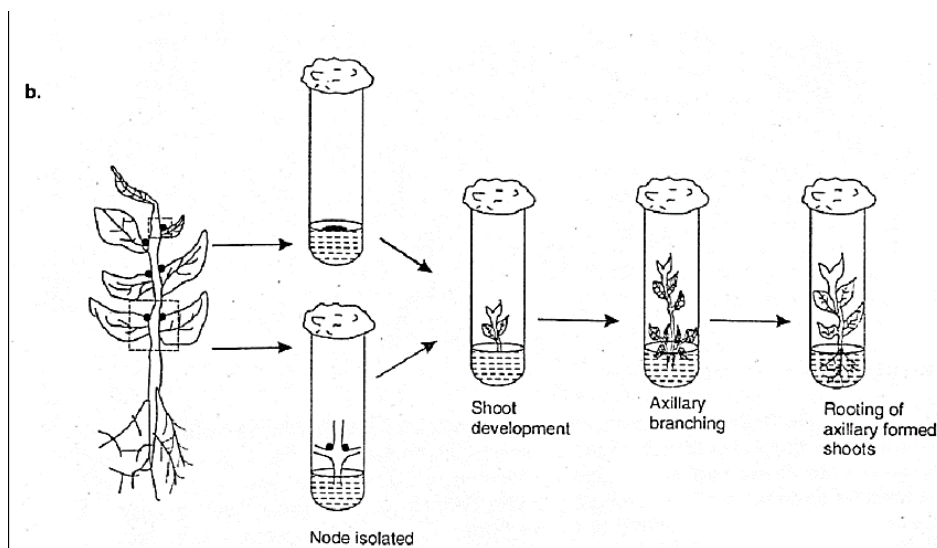
In vitro metoda kulture meristema ima brojne primjene u biljnoj biotehnologiji i poljoprivredi. Najčešća je metoda dobivanja bezvirusnih biljaka radi pretpostavke da je tkivo meristema obično slobodno od virusa. Sama tehnika podrazumijeva uzimanje malog komadića tkiva meristema (obično veličine oko 1 mm) i njegovo postavljanje na sterilnu hranidbenu podlogu koja sadrži sve potrebne hranjive tvari, vitamine i hormone potrebne za rast i razvoj meristema. Potom se prati rast i razvoj eksplantata u biljčicu koja se kasnije ispituje na prisutnost virusa, odnosno odsutnost onog virusa zbog kojeg je biljka krenula u postupak ozdravljenja od virusa. Pokazalo se da će uspjeh ovisiti o tipu pupa (vršni ili bočni) i o položaju (bazalni ili terminalni) (Jelaska 1994.). Također, postotak oslobođenih biljaka od virusa ovisi i o vegetacijskoj sezoni kada se kultura meristema postavlja (Marković i sur. 2014.).



Slika 3.4.1. Shema metode kulture meristema

(izvor: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-the-complete-thermotherapy-process-and-culture-of-apical-meristems_fig1_319905481)

Metoda aksilarnog pupanja (slika 3.4.2.) vrlo je slična metodi kulture pojedinačnog nodija, te zajedno s njom spada u najbitnije i najčešće metode razmnožavanja vinove loze *in vitro*. Kod metode aksilarnog pupanja vegetacijski vršak se izolira te se pomoću velike koncentracije citokinina u hranidbenoj podlozi zaustavlja apikalna dominacija što dovodi do pupanja bočnih pupova. Stopa umnažanja vrlo je visoka što je vrlo važno u *in vitro* kulturi, genetička stabilnost je očuvana što je vrlo važno kod vinove loze ako se radi na klonovima i sortama.



Slika 3.4.2. Shema metode aksilarnog pupanja

(izvor: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-Representation-of-Axillary-Bud-Method-of-Vegetatively-Propagating-Plants-a_fig3_324529039)

Kod provedbe istraživanja kombinirale su se dvije metode, metoda kulture meristema i metoda aksilarnog pupanja.

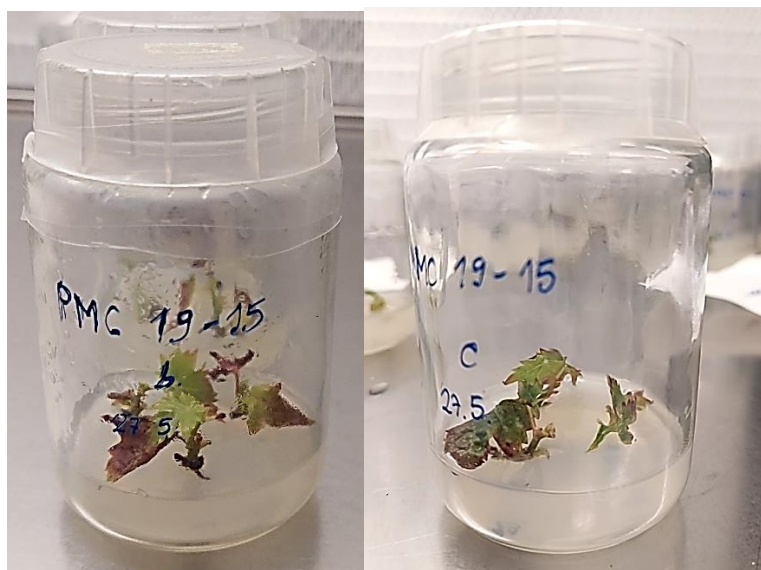
3.5. Provedba pokusa

Rozgve klonova prikupljene su 5. ožujka 2021. godine i ostavljene u vodi u prostoriji sobne temperature kako bi se potaknulo pupanje. Rozgve su ostavljene dok se nisu razvili mladi izbojci (slika 3.5.1.), a potom su uneseni u *in vitro* kulturu u periodu od dva tjedna.



Slika 3.5.1. Rozgve sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' prikupljene za istraživanje
(izvor: A. Šišak)

Izbojci s nekoliko nodija (ovisno o sorti i klonu) očišćeni su temeljito vodom od vanjskih nečistoća, odstranjeni su im listovi te su prošli kroz postupak sterilizacije. Nakon sterilizacije u kontroliranim uvjetima izolirani su eksplantati na temelju kategorije pupa pojedinog klona (a – apikalni meristem, b – 2. i 3. pup na početnom izdanku i c – 4. i 5. pup na početnom izdanku) te su inokulirani na hranidbeni B incijalni medij u frutke prema ranije utvrđenom protokolu (Marković i sur. 2014.) (slika 3.5.2).



Slika 3.5.2. Izolirani eksplantatni kloni PMC 19-15 sorte 'Pošip' prema kategoriji pupa
(izvor: A. Šišak)

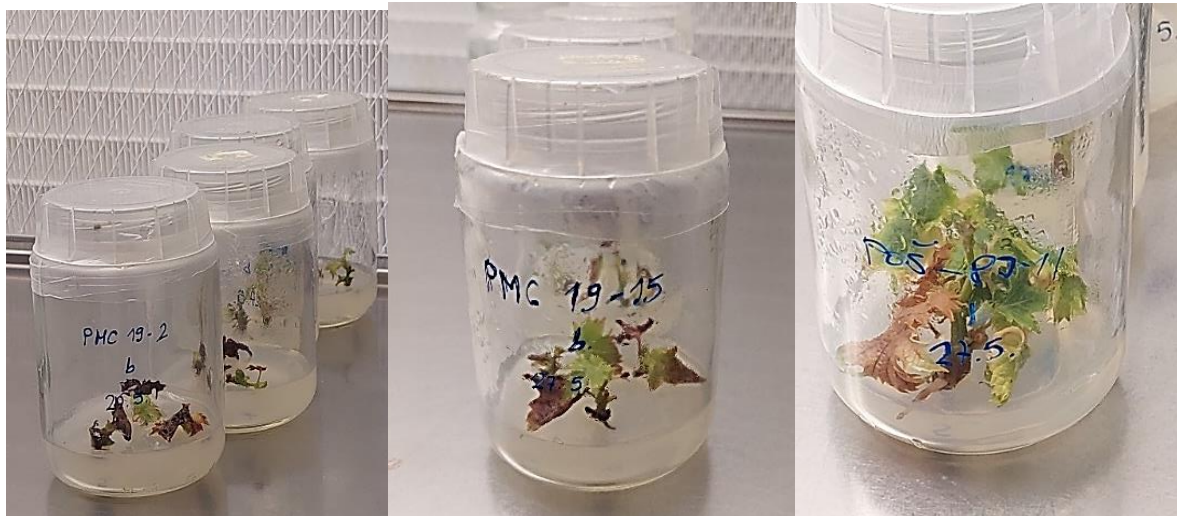
U periodu od četiri tjedna pratio se rast i razvoj eksplantata nakon čega je uslijedilo mjerenje visine (slika 3.5.3.) i broja nodija eksplantata. Nakon prikupljenih podataka eksplantati su subkultivirani na svježju hranidbenu podlogu. Prilikom praćenja uočen je neujednačen rast i razvoj na B inicijalnom mediju, kao i nastajanje kalusa na većini eksplantata pa su eksplantati subkultivirani na standardni MS medij. Pratila se kategorija pupa pa su razvijeni eksplantati sađeni na medij u frutke s praćenjem njihovog ishodišnog podrijetla na izdanku da bi se utvrdio utjecaj kategorije pupa na rast i razvoj biljaka. Tako su nastale tri kategorije pupova: a - apikalni, b - 2. i 3. pup i c - 4. i 5. pup. Prilikom subkultivacije eksplantatima su odstranjeni listovi i kalusi za daljnji rast u sljedeća četiri tjedna do sljedećeg planiranog mjerenja. Nakon osam tjedna pratio se rast i razvoj eksplantata te je potom odrađeno drugo mjerenje visine i broja nodija (slika 3.5.4.) kako bi se pratio utjecaj sorte i sanitarnog statusa na rast i razvoj postavljene kulture *in vitro*. U drugom mjerenju smanjen je nastanak kalusa, no uočeno je postupno sušenje eksplantata (slika 3.5.5.). Izmjerene su visine, broj nodija i duljine kalusa razvijenih eksplantata čiji su podaci obrađeni jednosmjernom analizom varijance ANOVA, te je proveden DUNCAN test radi usporedbe srednjih vrijednosti među genotipovima (XLSTAT 2007.).



Slika 3.5.3. Prvo mjerjenje visine i broja nodija (nakon 4 tjedna)
(izvor: A. Šišak)



Slika 3.5.4. Drugo mjerjenje visine i broja nodija (nakon 8 tjedana)
(izvor: A. Šišak)



Slika 3.5.5. Pojava posmeđenja tkiva na eksplantata klona PMC 19-15, PMC 19-2 i POŠ 89-11 sorte 'Plavac mali'
(izvor: A. Šišak)

4. Rezultati i rasprava

Istraživanje se provelo na klonovima sorata 'Plavac mali' i 'Pošip', od kojih su četiri inficirani ekonomski značajnim virusima, dok su dva *virus-free*. Pomoću *in vitro* metode kulture meristema pratio se rast i razvoj eksplantata. Nakon četiri i osam tjedana vršilo se mjerenje parametra visine, broja nodija i pojave kalusa. Prikupljeni podaci analizirani su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) pomoću koje se mogu utvrditi postojanje signifikantnih razlika utjecaja klona, položaja pupa i sanitarnog statusa između eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' *in vitro* u ispitivanim parametrima.

4.1. Utjecaj klona sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' na rast i razvoj eksplantata *in vitro*

Svaka sorta vinove loze drugačije reagira u *in vitro* uvjetima, kao što je situacija i u vinogradu. Radi usporedbe dviju sorti ('Plavac mali' i 'Pošip') i njihovih klonova pratili su se sljedeći parametri visine, broja nodija i stvaranja kalusa u *in vitro* kulturi.

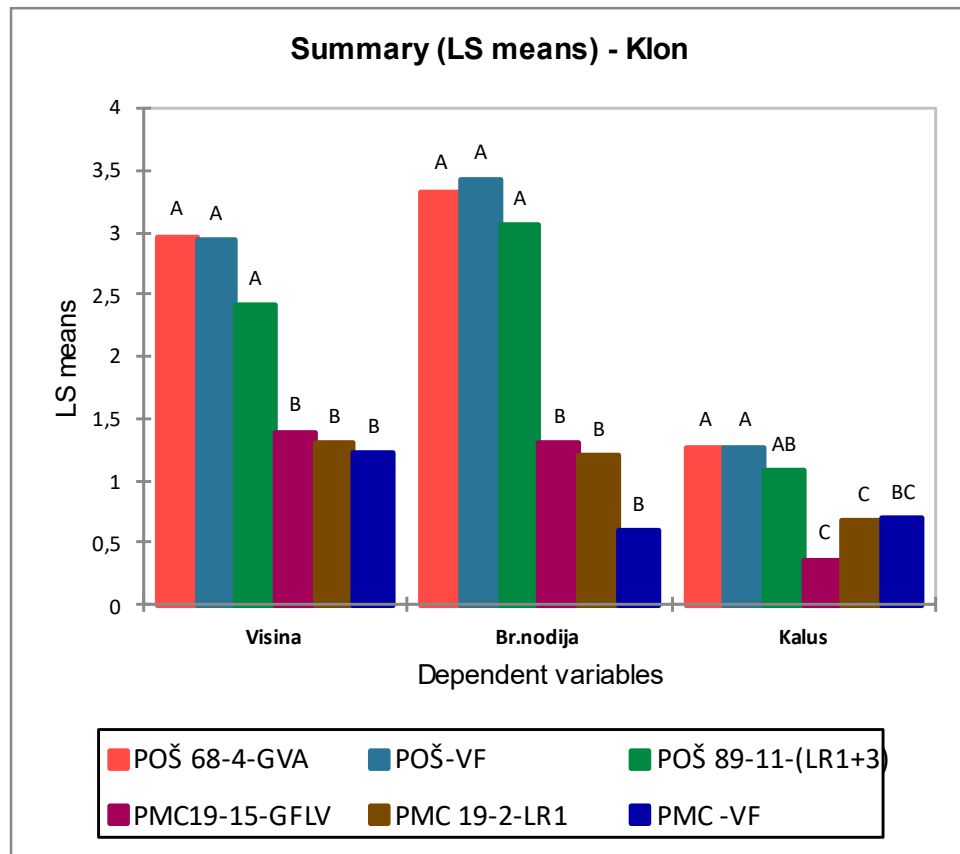
Tablica 4.1.1. Utjecaj sorte na rast i razvoj eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' *in vitro* u ispitivanim parametrima visine, broja nodija i pojave kalusa

| Kategorija | Visina | Br.nodija | Kalus |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| POŠ 68-4 (GVA) | 2,967 A | 3,333 A | 1,273 A |
| POŠ (<i>virus-free</i>) | 2,932 A | 3,421 A | 1,268 A |
| POŠ 89-11 (LR1 +LR3) | 2,411 A | 3,053 A | 1,084 AB |
| PMC19-15 (GFLV) | 1,390 B | 1,300 B | 0,365 C |
| PMC 19-2 (LR1) | 1,300 B | 1,200 B | 0,680 C |
| PMC (<i>virus-free</i>) | 1,220 B | 0,600 B | 0,700 BC |
| Pr > F(Klon) | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 |
| Significant | Yes | Yes | Yes |

(Različita slova predstavljaju značajno različite vrijednosti prema Duncanovom testu, $P \leq 0,05$)

U tablici 4.1.1. izračunate su prosječne vrijednosti visine, broja nodija i kalusa kod klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip'. Dobivene prosječne vrijednosti izračunate su iz podataka koji su prikupljeni nakon četiri i osam tjedana od postavljanja *in vitro* kulture. Na temelju prosječnih vrijednosti utvrđena je signifikantna razlika (s 95% točnosti) između sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' što ukazuje na signifikantan utjecaj sorte na rast i razvoj eksplantata *in vitro*. Prema provedenom Duncan testu usporedbe srednjih vrijednosti u parametrima visine, broja nodija i kalusa, tablica 4.1.1. i graf 4.1.1.

pokazuju podjelu na temelju sorte. Klonovi sorte 'Pošip' svrstani su u kategoriju A i njihove prosječne vrijednosti visine i broja nodija značajno se razlikuju od prosječnih vrijednosti visine i broja nodija klona sorte 'Plavac mali' koji je svrstan u kategoriju B.



Graf 4.1.1. Utjecaj sorte na rast i razvoj eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' *in vitro* u ispitivanim parametrima visine, broja nodija i pojave kalusa

4.2. Utjecaj kategorije pupa na rast i razvoj eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' *in vitro*

Posebna kategorija koja se pratila u ovom istraživanju bila je kategorija pupa pomoću koje se htjelo utvrditi postoji li značajna razlika u rastu i razvoju eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' s obzirom na kojeg se položaja na početnom izdanku sa drvenaste reznice razvio eksplantat.

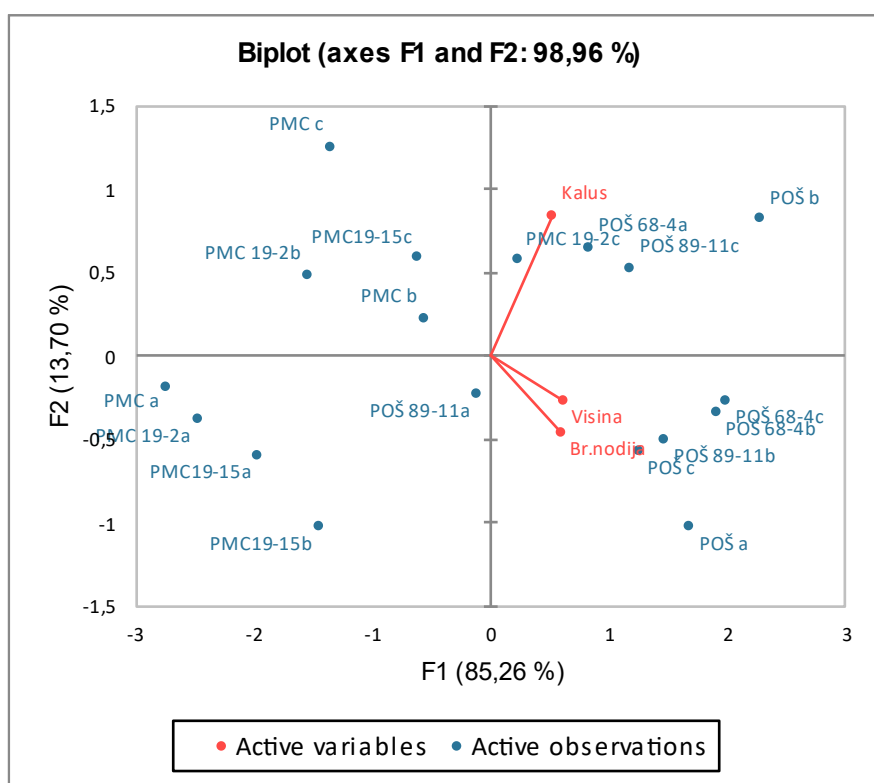
Tablica 4.2.1. Utjecaj kategorije pupa na rast i razvoj eksplantata sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' *in vitro* u ispitivanim parametrima visine, broja nodija i pojave kalusa

| Klon i kategorija pupa | Visina | Br.nodija | Kalus |
|------------------------|------------|------------|-----------|
| POŠ 68-4c | 3,167 a | 3,667 a | 1,233 bc |
| POŠ 68-4b | 3,117 a | 3,667 a | 1,183 bcd |
| POŠ b | 3,038 a | 3,250 ab | 1,788 a |
| POŠ a | 3,100 a | 4,000 a | 0,833 bcd |
| POŠ 89-11b | 2,775 ab | 3,625 a | 1,013 bcd |
| POŠ 89-11c | 2,314 abc | 2,857 abc | 1,386 ab |
| POŠ 68-4a | 2,300 abc | 2,250 abcd | 1,325 abc |
| POŠ c | 2,763 ab | 3,375 a | 0,912 bcd |
| PMC 19-2c | 1,971 abcd | 1,857 bcd | 1,129 bcd |
| POŠ 89-11a | 1,850 abcd | 2,250 abcd | 0,700 cd |
| PMC19-15c | 1,488 bcd | 1,250 d | 0,912 bcd |
| PMC b | 1,800 abcd | 1,250 cd | 0,750 bcd |
| PMC c | 0,950 cd | 0,250 d | 1,000 bcd |
| PMC19-15b | 1,300 cd | 1,750 cd | 0,000 e |
| PMC 19-2b | 0,900 d | 0,750 d | 0,625 d |
| PMC19-15a | 1,375 cd | 0,500 d | 0,000 e |
| PMC 19-2a | 0,650 d | 0,500 d | 0,000 e |
| PMC a | 0,600 d | 0,000 d | 0,000 e |
| Pr > F(Klon) | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 |
| Significant | Yes | Yes | Yes |

Prosječne vrijednosti visine, broja nodija i kalusa klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' izračunate su za svaku kategoriju pupa svakog genotipa koji je bio ispitivan u ovom istraživanju (tablica 4.2.1.). Pomoću ANOVA-e utvrdile su se određene razlike između kategorija pupova unutar jednog genotipa, a također između ispitivanih genotipova. Uspoređujući klonove sorte 'Pošip', klonovi se međusobno ne razlikuju u rastu i razvoju eksplantata u kategoriji pupa tijekom cijekupnog perioda provedbe istraživanja, ali se značajno razlikuju od klonova 'Plavca malog', s iznimkom na klon PMCb (*virus-free*) (2. i 3. pup na izbojku) i PMC 19-2c (4. i 5. pup na izbojku) s kojima ne pokazuju značajnu razliku. Uspoređujući parametar broja nodija, klonovi sorte 'Pošip' ne pokazuju međusobno značajnu razliku u kategoriji pupa, no postoji značajna razlika sa klonovima sorte 'Plavac mali', s iznimkom na klonove POŠ 68-4a (apikalni meristem) i POŠ 89-11a s kojima se ne razlikuju značajno. Uspoređujući parametar pojave kalusa, klonovi PMC 19-15a i b, PMC (*virus-free*) i PMC 19-2a značajno se razlikuju od ostatka ispitivanih klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' u kategoriji pupa.

Klon POŠb (*virus-free*) signifikantno se razlikuje u kategoriji pupa od ostalih klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip', s iznimkom na klon POŠ 89-11c i POŠ 68-4a. Ostali klonovi međusobno ne pokazuju signifikantne razlike.

Radi velike količine podataka i varijabli za promatranje za ovu kategoriju uz ANOVA-u napravljena je analiza glavnih komponenti (engl. principal component analysis ili PCA). Pomoću nje podaci se svrstavaju u kvadrante radi bolje vizualizacije i interpretacije podataka. Rezultati analize glavnih komponenti (Principal Component Analysis, PCA) prikazani su na grafu 4.2.1.



Graf 4.2.1. PCA analiza podataka za utjecaj položaja pupova na rast i razvoj klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' *in vitro*

PCA analizom objašnjeno je 98,96% varijabilnosti, a klonovi sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' jasno su se razdvojili na temelju ispitivanih parametara *in vitro* kulture (visina, broj nodija, kalus) (graf 4.2.1.). U I. kvadrantu izdvojili su se klonovi sorte 'Pošip' koji su tijekom rasta i razvoja *in vitro* razvili najviše kalusnog tkiva, a to su POŠb, POŠ 68-4a, POŠ 89-11c. Među klonovima sorte 'Plavac mali', izdvojio se PMC 19-2c, kao klon s najviše razvijenog kalusnog tkiva. U IV. kvadrantu izdvojili su se klonovi koji su dobro rasli u *in vitro* kulturi, odnosno imali su najveći broj nodija i visinu. Rezultati analize pokazuju kako najbolji rast su imali klonovi sorte 'Pošip', i to POŠ a i c, POŠ 89-11b,

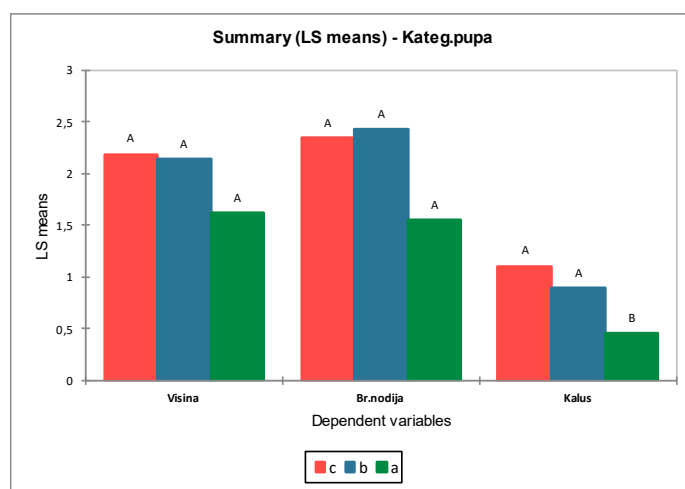
POŠ 68-4b i c. Klonovi sorte 'Plavac mali' smjestili su se u II. i III. kvadrantu te ih karakterizira niža visina i broj nodija u odnosu na klonove sorte 'Pošip'. Međutim, sorta 'Plavac mali' pokazuje niži razvoj kalusnog tkiva u odnosu na sortu 'Pošip'. To je vidljivo i iz tablice 4.2.1. (4. stupac „Kalus“)

Također, bilo je potrebno utvrditi postoje li značajne razlike između tri kategorije pupova (a, b i c) na početnom izdanaku sa drvenastih reznica i njihov utjecaj na rast i razvoj eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' *in vitro*.

Tablica 4.2.2. Utjecaj kategorije pupa na rast i razvoj eksplantata *in vitro* u ispitivanim parametrima visine, broja nodija i pojave kalusa

| Kategorija | Visina | Br.nodija | Kalus |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| c | 2,185 a | 2,341 a | 1,102 a |
| b | 2,143 a | 2,429 a | 0,893 a |
| a | 1,620 a | 1,550 a | 0,450 b |
| Pr > F (Kategorija pupa) | 0,180 | 0,136 | 0,001 |
| Significant | No | No | Yes |

Pratilo se mjerenje uvažavajući kategoriju pupa na početnom izdanku, te je napravljena analiza prosječnih vrijednosti istih (tablica 4.2.2.). Na temelju podataka, utvrdilo se kako ne postoje značajne razlike između kategorija pupova a, b i c u ispitivanim parametrima visine i broja nodija, odnosno položaj s kojeg je uzet pup na početnom izdanku sa drvenaste reznice nije značajno utjecao na rast i razvoj eksplantata *in vitro*. Međutim, značajne razlike utvrđene su kod parametra pojave kalusa između kategorija pupova a, b i c, što je vidljivo i na grafu 4.2.2.



Graf 4.2.2. Usporedba između kategorija pupova u rastu i razvoju eksplantata sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' u ispitivanim parametrima visine, broja nodija i pojave kalusa *in vitro*

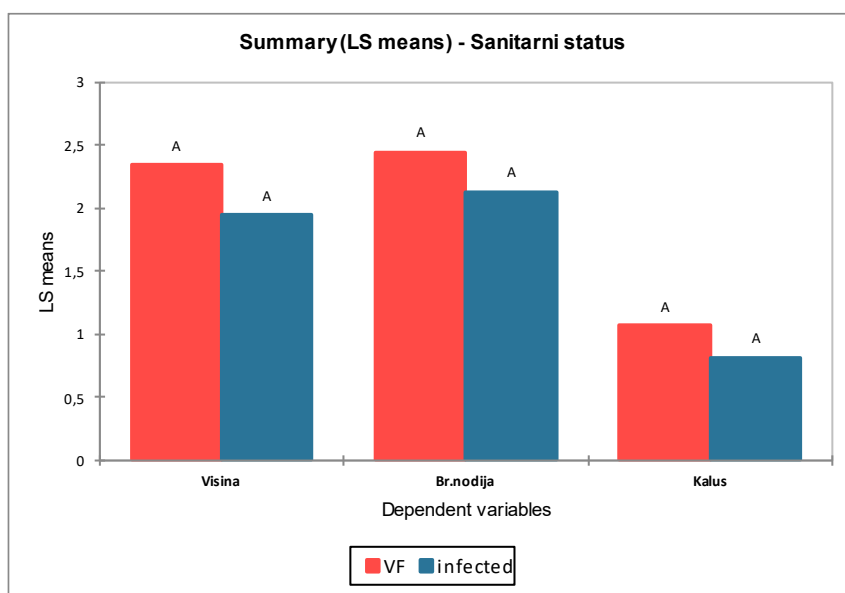
4.3. Utjecaj sanitarnog statusa na rast i razvoj eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' *in vitro*

Pratio se utjecaj sanitarnog statusa na rast i razvoj eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' *in vitro*. Neovisno o kojoj se zarazi radilo, usporedili se se zdravi i zaraženi klonovi kako bi se utvrdilo postoje li signifikantne razlike između dva zdrava genotipa (*virus-free*) i četiri zaražena genotipa.

Prosječne vrijednosti visine, broja nodija i kalusa izračunate su za zaražene i *virus-free* klonove sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' te se pomoću njih utvrdio utjecaj sanitarnog statusa na rast i razvoj u *in vitro* kulturi. Statistički podaci ANOVA-e pokazuju kako ne postoji signifikantna razlika između zaraženih i *virus-free* klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' u rastu i razvoju eksplantata *in vitro* što se očituje iz tablice 4.3.1. i grafa 4.3.1.

Tablica 4.3.1. Utjecaj sanitarnog statusa na rast i razvoj eksplantata klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' *in vitro*

| Kategorija | Visina | Br.nodija | Kalus |
|----------------------------------|---------|-----------|---------|
| VF (<i>virus-free</i>) klonovi | 2,341 a | 2,448 a | 1,072 a |
| Zaraženi klonovi | 1,947 a | 2,135 a | 0,819 a |
| Pr > F (Sanitarni status) | 0,129 | 0,401 | 0,074 |
| Significant | No | No | No |



Graf 4.3.1. Usporedba zaraženih i *virus-free* klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' u ispitivanim parametrima visine, broja nodija i pojave kalusa *in vitro*

5. Zaključak

Rezultati istraživanja na eksplantatima klonova sorata "Plavac mali" i "Pošip" u *in vitro* uvjetima, uzimajući u obzir ispitivane parametre visine, broja nodija i pojave kalusa, dovode do sljedećih zaključaka:

1. Utvrđena je signifikantna razlika (s 95% točnosti) između sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' što ukazuje na utjecaj genetske razlike između dviju sorti u pogledu njihovog rasta i razvoja *in vitro* u parametrima visine, broja nodija i stvaranja kalusa. Unutar iste sorte ('Plavac mali' ili 'Pošip') među klonovima ne postoje signifikantne razlike.
2. S obzirom na utjecaj klona s podatkom o kategoriji pupa, utvrđena je signifikantna razlika u rastu i razvoju eksplantata sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' unutar klonova jednog genotipa i između ispitivanih genotipova na temelju kategorije pupa. Najbolji ostvaren rast u parametrima visine i broja nodija ostvarili su klonovi POŠ a i c, POŠ 89-11b te POŠ 68-4b i c sorte 'Pošip', dok su klonovi POŠb, POŠ 68-4a i POŠ 89-11c razvili najviše kalusnog tkiva. Klonovi sorte 'Plavac mali' ostvarili su niži rast u visini i broju nodija te su pokazali niži razvoj kalusnog tkiva u odnosu na sortu "Pošip". Dodatno je PCA analizom objašnjeno 98,96% varijabilnosti, a klonovi sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' jasno su se razdvojili na temelju ispitivanih parametara *in vitro* kulture (visina, broj nodija, kalus).
3. Utjecaj kategorije pupa na početnom izdanku sa drvenaste reznice (bez podatka o genotipu) nije se pokazao signifikantnim u ispitivanim parametrima visine i broja nodija, no utvrđene su signifikantne razlike između kategorija pupova u parametru pojave kalusa u *in vitro* uvjetima.
4. Utjecaj sanitarnog statusa nije pokazalo signifikantne razlike između zaraženih i *virus-free* klonova sorata 'Plavac mali' i 'Pošip' u parametrima visine, broja nodija i pojavi kalusa, sugerirajući da infekcija virusima nije značajno utjecala na rast i razvoj eksplantata *in vitro*.

6. Dodaci

6.1. Popis skraćenica u tekstu

| KRATICA | PUNI NAZIV |
|------------|---|
| ANOVA | jednosmjera analiza varijanci |
| ArMV | Virus mozaika gušarke |
| BA | benziladenina |
| BAP | 6-benzilaminopurina |
| ELISA test | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| GFLV | Virus lepezastog lista vinove loze |
| GLRaV-1 | Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 |
| GLRaV-2 | Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2 |
| GLRaV-3 | Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 |
| GVA | A-virus vinove loze |
| GVB | B-virus vinove loze |
| ha | hektar |
| IAA | indol-3-octene kiseline |
| MS medij | Murashige i Skoog medij |
| PCA | analize glavnih komponenti |
| RT-PCR | metoda reverzne transkripcije - lančane reakcije polimeraze |

7. Popis literature

1. Andabaka Ž., Divić M., Jerković T., Stupić D., Marković Z., Preiner D., Maletić E., Karoglan Kontić J., Vončina D., Tomaz I., Šikuten I. (2022.) Sanitary status of three Croatian native grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) from Dalmatia region included in clonal selection, *Journal of Central European Agriculture*, 23(3), p.533-539
2. Čarija M., Radić T., Cerni S., Mucalo A., Zdunić G., Vončina D., Jagunić M., Hančević K. (2022.) Prevalence of Virus Infections and GLRaV-3 Genetic Diversity in Selected Clones of Croatian Indigenous Grapevine Cultivar Plavac Mali. *Pathogens*, 11, 176
3. Díaz-Barrita J., Norton M., Martínez-Peniche R. A., Uchanski M., Mulwa R., Skirvin R. M. (2008) The Use of Thermo-therapy and *in vitro* Meristem Culture to Produce Virus-Free 'Chancellor' Grapevines, *International Journal of Fruit Science*, 7:3, 15-25
4. Đurić – Stjepanović K. (2021.) Ekonomski značajni virusi vinove loze u vinogradima u okolici Poreča, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, diplomski rad – preuzeto: 2023-01-16
5. Hancević K., Zdunic G., Vončina D., Radić T. (2015.) Virus composition influences virus elimination success and *in vitro* growth characteristics of the grapevine cv. Plavac mali, *Journal of Plant Pathology*, 97 (1), 199-202
6. Ivić D., Fazinić T. (2011.) Gospodarski značajni virusi vinove loze, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb, str. 6-26
7. Jelaska S. (1994.) Kultura biljnih stanica i tkiva, Školska knjiga, Zagreb, str. 5-22, 70-81., 212.-222.
8. Malenica N., Jagić M., Pavletić B., Bauer N., Vončina D., Zdunić G., Leljak Levanić D. (2020.) Somatic embryogenesis as a tool for virus elimination in Croatian indigenous grapevine cultivars, *Acta Botanica Croatica*, Vol. 79 No. 1,
9. Maletic E., Karoglan Kontić J., Pejić I., Preiner D., Zdunić G., Bubola M., Stupić D., Andabaka Ž., Marković Z., Šimon S., Žulj Mihaljević M., Ilijaš I., Marković D. (2018.) Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze, Zagreb, e-knjiga
10. Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J. (2008.) Vinova loza - Ampelografija, ekologija, oplemenjivanje. Školska knjiga. Zagreb, str. 14-22,170.
11. Marković Z., Milković M., Karoglan Kontić J., Preiner D. (2021.) Usporedba klasičnog i *in vitro* razmnožavanja vinove loze, *Glasnik Zaštite Bilja*, Vol. 44. No. 5.
12. Marković Z., Preiner D. (2011.) Biotehnologija u vinogradarstvu, *Glasnik zaštite bilja* 1/2011.
13. Marković Z., Preiner D., Mihovilović Bošnjak A., Safner T., Stupić D., Andabaka Ž., Maletić E., Chatelet P., Engelmann F., Karoglan Kontić J. (2014.) *In vitro* introduction of healthy and virus-infected genotypes of native Croatian grapevine cultivars, *Central European Journal of Biology*, 9(11), 1087-1098
14. Marković Z., Zrilić A., Šikuten I., Štambuk P., Tomaz I., Vončina D., Maletić E., Karoglan Kontić J., Preiner D. (2021.) Cultivar and Phenological Stage Effects on the Success of *In Vitro* Meristem Culture and GLRaV-3

- Elimination of Croatian Autochthonous Grapevine Cultivars, *Agronomy* 11(7), 1395
15. Martelli G.P., Boudon-Padieu E. (2006.) *Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004*, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, p. 279, Italy
 16. Meng B., Martelli G. P., Golino D. A., Fuchs M. (2017.) *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, Springer Nature, Switzerland
 17. Mirošević N., Karoglan Kontić J. (2008.) *Vinogradarstvo*, Nakladni zavod globus d.o.o., Zagreb, str. 1-7, 80., 88.,
 18. Mirošević N., Turković Z. (2003.) *Ampelografski atlas*, Golden marketing - tehnička knjiga, Zagreb
 19. Park S. (2021.) *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*, Fourth Edition, e-book, pristup - 5.9.2023., p: 34
 20. Preiner D., Maletić E., Karoglan Kontić J., Marković Z., Stupić D., Andabaka Ž., Šikuten I., Štambuk P., Rendulić N., Tomaz I., Tuščić V., Pejić I., Šimon S. (2022.) *Katalog registriranih klonova sorata vinove loze Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 6. pristup- 28.08.2023.
 21. Šikuten I. (2016.) *In vitro razmnožavanje virusima zaraženih genotipova vinove loze u postupku ozdravljivanja krioterapijom: diplomski rad*
 22. Vončina D. (2021.) *Rasprostranjenost ekonomski važnih virusa vinove loze u Republici Hrvatskoj i njihov utjecaj na vinogradarsku proizvodnju*, Glasilo biljne zaštite 3/2021
 23. Vončina D., Badurina D., Preiner D., Cvjetković B., Maletić E., Karoglan Kontić J. (2011.) *Incidence of virus infections in grapevines from Croatian collection plantations*, *Phytopathologia Mediterranea* Vol. 50, No. 2, pp. 316-326
 24. Vončina D., Diaz-Lara A., Preiner D., Al Rwahnih M., Stevens K., Jurić, S., Malenica N., Šimon S., Meng B., Maletić E., Fulgosi H., Cvjetković B. (2022.) *Virus and Virus-like Pathogens in the Grapevine Virus Collection of Croatian Autochthonous Grapevine Cultivars*, *Plants*, 11(11), 1485
 25. Vončina D., Preiner D., Radović D., Maletić E., Karoglan Kontić J. (2012.) *Prevalence of viruses in autochthonous grapevine cultivars from Croatian Continental and Coastal vine-growing regions*
 26. Vončina D., Preiner D., Šimon S., Cvjetković B., Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J. (2019.) *Distribution of nine viruses in Croatian autochthonous grapevine (Vitis vinifera L.) cultivars from Dalmatian region included in clonal selection*, *Journal of Central European Agriculture*, 20(1), p.262-273
 27. XLSTAT (2007) *Statistical Software for Excel*. <https://www.xlstat.com/en/>

8. Životopis

Ana Šišak rođena je 2. studenog 1998. u Zagreb. Svoje obrazovanje započela je u osnovnoj školi Sesvetska Sopnica koje je nastavila u III. gimnaziji u Zagreb u periodu od 2013.- 2017. godine. Upisuje 2017. godine preddiplomski studij na Agronomskom fakultetu smjer Agroekologija i završava ga 2020. godine. Te iste godine upisuje diplomski studij Vinogradarstvo i vinarstvo na istom fakultetu koji trenutno još uvijek traje. Tijekom svog studiranja na diplomskom studiju sudjeluje u natjecanju mladih u ocjenjivanju vina Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation u Parizu kao predstavnik Hrvatske te sudjeluje u ocjenjivanju vina u sklopu projekta Vinske zvijezde. Također, sudjeluje u raznim izvannastavnim aktivnostima Vinarske grupe i Ampelografske grupe, pomaže u *in vitro* laboratoriju Zavoda za Vinogradarstvo i vinarstvo te odrađuje praksu na fizikalno-kemijskim analizama vina u Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu (Odjel za fizikalno kemijska ispitivanja). Uz sve nastavne obaveze također odrađuje studentske poslove. Od stranih jezika ima odlično poznavanje u govoru, pismu te komunikaciji engleskog jezika. Od ostalih vještina dobro se snalazi u MS officu i posjeduje B vozačku dozvolu.