

Utjecaj zaraze G-virusom (GVG) i badnavirusom (GBV-1) vinove loze na rast vinove loze u kulturi meristema in vitro

Gelendir, Antonela

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:204:451273>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Utjecaj zaraze G-virusom (GVG) i badnavirusom
(GBV-1) vinove loze na rast vinove loze u kulturi
meristema *in vitro***

DIPLOMSKI RAD

Antonela Gelendir

Zagreb, lipanj, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Vinogradarstvo i vinarstvo

**Utjecaj zaraze G-virusom (GVG) i badnavirusom
(GBV-1) vinove loze na rast vinove loze u kulturi
meristema *in vitro***

DIPLOMSKI RAD

Antonela Gelendir

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Zvezdana Marković

Zagreb, lipanj, 2023.
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Antonela Gelendir, JMBAG 0178113580, rođena 11.02.1999. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Utjecaj zaraze G-virusom (GVG) i badnavirusom (GBV-1) vinove loze na rast vinove loze u kulturi meristema *in vitro*

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 studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice Antonela Gelendić, JMBAG 0178113580, naslova

**Utjecaj zaraze G-virusom (GVG) i badnavirusom (GBV-1) vinove loze na rast vinove loze u
kulturi meristema *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

Ovime zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Zvezdana Marković na pomoći oko izrade istraživanja, stručnom vođenju kroz diplomski rad i na svom znanju koje mi je prenijela tijekom rada u *in vitro* laboratoriju. Zahvaljujem svim profesorima i asistentima Zavoda za Vinogradarstvo i vinarstvo na prijateljskim i profesionalnim savjetima. Puno hvala izv. prof. dr. sc. Darku Vončini na korisnim savjetima tijekom izrade rada i dr. sc. Martinu Jaguniću na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Velika hvala mojoj obitelji koja me poticala od početka studiranja, posebno roditeljima koji su mi omogućili školovanje i pružili podršku u svakoj odluci koja bi značila moj napredak i baki koja mi je usadila vjeru u sebe. Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali studentske dane osobito Anji koja je uz mene od prvog dana studiranja i kolegicama Anji i Petri i Valentini uz koje je svaka praksa bila uzbudljiva i puna smijeha.

Sadržaj

1. Uvod.....	3
2. Cilj istraživanja.....	4
3. Pregled literature.....	5
3.1. Vinova loza i njezin značaj	5
3.2. Povijest vinove loze na području Hrvatske	5
3.3. Autohtoni sortiment Hrvatske	6
3.3.1. Otkriveni virusi vinove loze u Republici Hrvatskoj.....	7
3.3.2. Revitalizacija autohtonog sortimenta u Republici Hrvatskoj.....	9
3.4. Virusni vinove loze	10
3.4.1. Gospodarski značajni virusi vinove loze	11
3.4.2. Mjere suzbijanja virusa vinove loze	12
3.4.3. Metode detekcije virusa vinove loze	12
3.5. Metode za dobivanje biljaka slobodnih od virusa	13
3.5.1. Kultura biljnog tkiva	14
3.5.2. Kultura meristema kao metoda ozdravljanja od virusa	14
3.5.3. Aklimatizacija	16
3.6. Utjecaj virusa i genotipa na rast i razvoj u <i>in vitro</i> kulturi	16
3.7. Virusni vinove loze otkriveni u novije vrijeme	18
3.7.1. G-virus vinove loze (GVG)	18
3.7.2. Badnavirus vinove loze 1 (GBV-1).....	20
3.7.3. Način prijenosa GVG i GBV-1	21
4. Materijali i metode	23
4.1. Sorte uključene u istraživanje	23
4.2. Postavljanje pokusa i sanitarni status sorata u istraživanju	24
4.3. Odabir i priprema hranidbenog medija	26
4.4. Uzorkovanje i sterilizacija biljnog materijala	27
4.5. Unos eksplantata u kulturu tkiva	28
4.6. Uvjeti uzgoja kulture tkiva	30
4.7. Presađivanje i praćenje rasta biljaka	30
4.8. Aklimatizacija biljaka	31
4.9. Krajnje testiranje metodom lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (<i>real-time</i> PCR).....	33

5. Rezultati i rasprava	34
5.1. Uspješnost početne kulture	34
5.2. Praćenje rasta biljaka u kulturi tkiva	36
5.2.1. Utjecaj zaraze virusima na rast biljaka u <i>in vitro</i> kulturi.....	39
5.2.2. Utjecaj genotipa na rast biljaka u kulturi tkiva	41
5.3. Uspješnost aklimatizacije.....	43
5.4. Uspješnost kulture tkiva i metode vršnog meristema u ozdravljivanju vinove loze od virusa.....	45
6. Zaključak	48
7. Popis literature	49
Prilog 1. Skraćeni nazivi u tekstu	54
Prilog 2. Popis tablica, grafova i slika u tekstu	55
Životopis	57

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Antonela Gelendir**, naslova

Utjecaj zaraze G-virusom (GVG) i badnavirusom (GBV-1) vinove loze na rast vinove loze u kulturi meristema *in vitro*

Vinogradarstvo Hrvatske obuhvaća uzgoj velikog broja sorata vinove loze i bazira se na uzgoju autohtonih sorata. Problem koji postaje sve izraženiji je njihova velika zaraženost virusima vinove loze. Istraživanje je provedeno na 10 autohtonih sorata vinove loze uzorkovanih iz Nacionalne kolekcije autohtonih sorata, kojima je prethodno utvrđena zaraza jednim ili oba od dva nova virusa vinove loze, G-virusa vinove loze (GVG) i badnavirusa vinove loze 1 (GBV-1). Koristila se kultura vršnog meristema kao metoda ozdravljenja od virusa, prilikom čega su izolirani vršni meristemi veličine 1 mm. Statističkom analizom utvrđena je signifikantna razlika između četiri odabrane sorte koje posjeduju dva ponavljanja ('Oskorušica', 'Tanetova loza', 'Silbijanac' i 'Petovka') s obzirom na % izraslih jedinki nakon 2 tjedna, dok kod jedinki regeneriranih nakon 4 tjedna nije utvrđena signifikantna razlika. Sanitarni status značajno je utjecao na rast i regeneraciju u kulturi tkiva, odnosno jedinke zaražene GBV-1 ostvarile su 77,8 % regeneracije, one zaražene GVG 78,9 % regeneracije tj. sanitarni status signifikantno utječe na % izraslih eksplantata nakon 2 tjedna ali ne i na % regeneriranih jedinki nakon 4 tjedna od unosa u kulturu tkiva. Mjerenjem visine nakon 5 tjedana, utvrđena je značajna razlika između sorata za dvije kategorije visine. Nakon postizanja visine, manji postotak biljaka je uspješno aklimatiziran (3,1 %), a vrlo nizak postotak biljaka je postigao uspješnu eliminaciju virusa iz biljnog tkiva ovom metodom vršnog meristema (0,9 %).

Ključne riječi: autohtone sorte, virusi vinove loze, kultura vršnog meristema

Summary

Diploma thesis of student **Antonela Gelendir**, title

The influence of grapevine G-virus (GVG) and badnavirus (GBV-1) infection on grapevine growth in meristem culture *in vitro*

Viticulture in Croatia encompasses the cultivation of a large number of grape varieties and is based on the cultivation of autochthonous varieties. A problem that is becoming more and more pronounced is their high infection with vine viruses. The research was carried out on 10 autochthonous grapevine varieties sampled from the National Collection of autochthonous varieties, which were previously found to be infected with one or both of two new grapevine viruses, grapevine virus G (GVG) and grapevine badnavirus 1 (GBV-1). Apical meristem culture was used as a method of recovery from the virus, during which apical meristems of 1 mm size were isolated. Statistical analysis revealed a significant difference between the four selected varieties that have two repetitions ('Oskorušica', 'Tanetova loza', 'Silbijanac' and 'Petovka') with regard to the % of grown individuals after 2 weeks, while no significant difference was found in individuals regenerated after 4 weeks. Sanitary status significantly influenced growth and regeneration in tissue culture, that is, individuals infected with GBV-1 achieved 77.8% regeneration, those infected with GVG 78.9% regeneration, respectively sanitary status significantly affects the % of explants grown after 2 weeks but not on the % of regenerated individuals after 4 weeks of introduction into tissue culture. By measuring the height after 5 weeks, a significant difference was found between the cultivars for the two height categories. After reaching height, a smaller percentage of plants were successfully acclimatized (3.1 %), and a very low percentage of plants achieved successful virus elimination from plant tissue by this apical meristem method (0.9 %).

Keywords: autochthonous grape cultivars, grapevine viruses, apical meristem culture

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) najrasprostranjenija je voćna vrsta na svijetu koja svojom ukupnom površinom uzgoja nadmašuje proizvodnju svih ostalih voćnih vrsta (Maletić i sur. 2008.). Povijest vinogradarske proizvodnje duga je koliko i povijest ljudske civilizacije. Široki areal uzgoja vinove loze i duga povijest, doveli su do bogate genetske raznolikosti ove biljne vrste i do razvoja velikog broja sorata vinove loze (Maletić i sur. 2018.). Većina sorata nastala je spontano, mutacijama ili spontanom križanjem. Na nastanak sorata imao je veliki utjecaj i sam čovjek, koji od davnina provodi selekciju i na taj način razmnožava one biljke koje sadrže bolje karakteristike od drugih. Vinova loza postupno je privedena kulturi, dolazilo je do induciranih križanja i oplemenjivanja. Rezultat toga je veliki broj sorata koje su specifične po podrijetlu, morfološkim, biološkim, fiziološkim i gospodarskim obilježjima (Maletić i sur. 2018.).

Problem prilikom uzgoja vinove loze danas, predstavlja velika zaraženost virusima vinove loze. Vinova loza je kultura za koju je poznat najveći broj biljnih virusa (Vončina 2021.). Virusi dovode do smanjenja životnog vijeka biljke, pada prinosa i kvalitete grožđa (Martelli 2014.). Redovito se otkrivaju novi virusi vinove loze. Jedni od virusa otkrivenih u novije vrijeme su G-virus vinove loze (GVG) i badnavirus vinove loze 1 (GBV-1). G-virus vinove loze prvi puta je pronađen na Novom Zelandu od strane Arnaud i sur. (2018.), odmah nakon toga pronađen je i na dvije hrvatske autohtone sorte (Vončina i Almeida 2018.). Badnavirus vinove loze 1 (GBV-1) prvi puta pronađen je u hrvatskim autohtonim sortama (Vončina i Almeida 2018.).

Hrvatsko vinogradarstvo bazira se na uzgoju autohtonih sorata. Autohtone sorte su od velike važnosti jer predstavljaju vrijednu kulturnu i prirodnu baštinu. Vrijedno svojstvo autohtonih sorata je da su prilagođene na specifične klimatske uvjete područja s kojega potječu i da su nosioci poželjnih svojstava. Virusi vinove loze vrlo su rasprostranjeni diljem Hrvatske na što ukazuju i dosadašnja istraživanja (Karoglan Kontić i sur. 2009.). Kao takvi virusi utječu na rast, razvoj i regeneraciju vinove loze. Vegetativni način razmnožavanja uvelike je pridonio širenju virusnih bolesti (Ivić i Fazinić 2011.). U prošlosti se ovome problemu nije pridavala velika važnost, ali svakim danom otkrivaju se novi virusi vinove loze i uočava se njihov negativan utjecaj na kulturu, što dovodi do potrebe za rješavanjem ovog problema. Iz tog razloga potrebno je primijeniti postupak ozdravljivanja genotipova vinove loze s ciljem stvaranja zdravog (bezvirusnog) sadnog materijala. Kao primjenjiva metoda oslobađanja biljnih vrsta od virusa navodi se kultura tkiva. Kultura biljnog tkiva *in vitro*, uz metodu izolacije vršnog meristema smatra se učinkovitim načinom eliminacije različitih vrsta biljnih virusa (Panattoni i sur. 2013.).

2. Cilj istraživanja

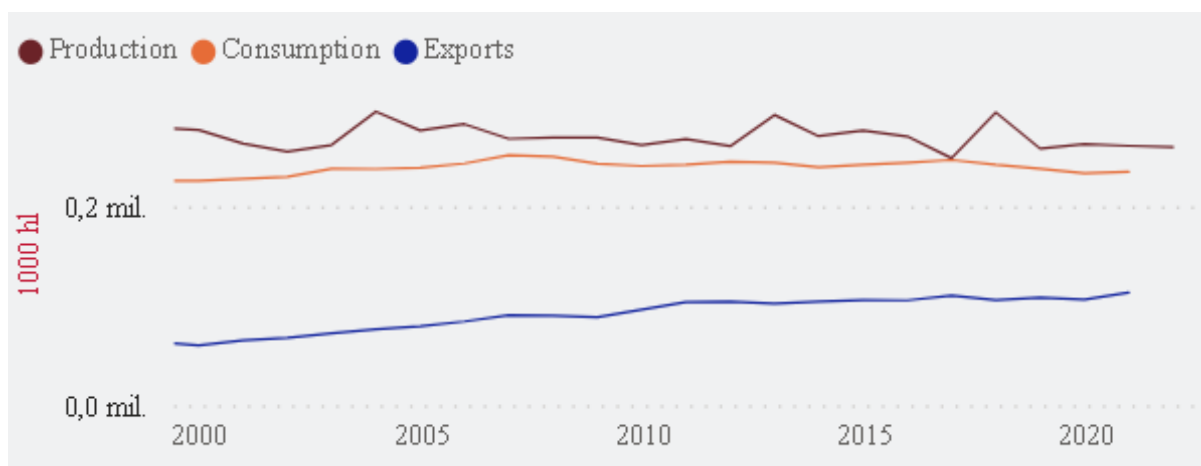
Cilj rada je utvrditi utjecaj zaraze G-virusom vinove loze (GVG) i badnavirusom vinove loze 1 (GBV-1) na rast i razvoj autohtonih hrvatskih sorata postupkom kulture vršnog meristema u *in vitro* uvjetima, te procijeniti mogućnost njihove eliminacije ovom metodom vegetativne propagacije.

3. Pregled literature

3.1. Vinova loza i njezin značaj

Vitis vinifera subsp. vinifera (*Vitis vinifera* L.) pripada vrsti euroazijske loze (*Vitis vinifera* L.) i podrodu *Euvitis*, koji zatim pripada rodu *Vitis* i porodici lozica (fam. *Vitaceae* Juss) (Maletić i sur. 2008.). Kultivirana je euroazijska loza koja se naziva još i plemenita, europska ili domaća loza nastala spontanom mutacijama iz divlje loze. Višegodišnja je jednodomna biljka, koja može biti samooplodna ili stranooplodna.

Prema zadnjem izvješću Međunarodne organizacije za lozu i vino (*International Organisation of Vine and Wine, OIV*) iz 2022. godine, u svijetu se 2021. godine vinova loza uzgajala na površini od 7298 865 ha. Zadnjih dvadeset godina na svjetskoj razini može se primijetiti blagi pad uzgoja vinove loze i proizvodnje vina (Slika 3.1.1.), što navode i podaci OIV-a (*International Organisation of Vine and Wine* 2022.).



Slika 3.1.1. Trend kretanja ukupne proizvodnje, potrošnje i izvoza vina u svijetu.

Izvor: <https://www.oiv.int/what-we-do/country-report?oiv>

3.2. Povijest vinove loze na području Hrvatske

Područje Republike Hrvatske ima dugu povijest uzgoja vinove loze i proizvodnje vina. Dokaz tomu su nalazišta fosilnih ostataka, ali i mnoge autohtone sorte nastale upravo na tome području. U blizini Krapine pronađena je okamina lista davno izumrlog roda *Cissetes*, kao najstariji fosilni ostatak na području Hrvatske (Maletić i sur. 2018.).

Prema Maletić i sur. (2018.), vinogradarstvo se na tlu Hrvatske kroz povijest širilo u dva pravca: kontinentalnim i primorskim dijelom. Dokaz tome je da se ta dva dijela uvelike razlikuju u bogatstvu autohtonih sorata vinove loze. U kontinentalni dio Hrvatske vinova loza donesena je kopnenim putem zahvaljujući Tračanima, koji su proširili kulturu proizvodnje vina na Ilirska plemena. Nakon toga širenje vinove loze teklo je dunavsko-dravsko-savskim međurječjem (Maletić i sur. 2018.). Za širenje vinove loze primorskim dijelom zaslužni su trgovci, osvajači i kolonizatori, stari Grci, Feničani i Tračani koji su proširili vinovu lozu Jadranskom obalom i otocima (Maletić i sur. 2018.). Prihvatanjem kršćanstva, prihvaća se kultura proizvodnje vinove loze i ispijanja vina, koje se smatralo pićem Boga i čovjeka.

Vina su se u prošlosti najčešće proizvodila od mješavine više sorata, dok je ime neke sorte prvi puta spomenuto u 14. stoljeću (Mirošević i sur. 2008.). Vrhunac vinogradarstva na području Hrvatske bio je u prvoj polovici 19. stoljeća. Ubrzo nakon toga u drugoj polovici 19. stoljeća dolazi do pojave koja je već pokorila dio Europe, a to su američke bolesti, pepelnica i plamenjača i filoksera kao štetnik koji je uzrokovao nepopravljivu štetu hrvatskom vinogradarstvu. Dolazi do masovnog propadanja vinograda i velike erozije autohtonog sortimenta. Obnova vinograda započela je odmah, cijepile su se osjetljive sorte na otporne američke podloge, što je zahtijevalo više posla za tadašnje vinogradare i dovelo do selekcije sorata u vinogradima. Razmnožavale su se one otpornije sorte s boljim karakteristikama, dok je većina autohtonih sorata trajno izgubljena.

Prema podacima Vinogradarskog registra (Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju; APPRRR) za 2022. godinu, Hrvatska ima oko 17 600 ha pod vinovom lozom. Gotovo deset puta manje od površina koje su bile pod ovom kulturom u 19. stoljeću prije pojave filoksere, kada je vinova loza rasla na 170 000 ha. Trend padanja površina pod vinovom lozom vidljiv je već dugi niz godina. Hrvatska je kroz povijest bila pod utjecajem mnogih prirodnih i gospodarskih nedaća, unatoč tome uspjela je zadržati veliku bioraznolikost. Podaci Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju ukazuju na to da tri najzastupljenije sorte u vinogradima Hrvatske čine: 'Graševina' (kao najzastupljenija), 'Malvazija istarska' i 'Plavac mali', od čega su druga i treća sorta po zastupljenosti autohtone i vrlo cijenjene kako u Hrvatskoj tako i u svijetu.

3.3. Autohtoni sortiment Hrvatske

Vinova loza značajna je kultura sa širokim arealom uzgoja u svim dijelovima Hrvatske. Autohtone sorte vinove loze, njih čak 130 čine prirodnu i kulturnu baštinu naše zemlje, kao takve ih treba tretirati i zaštititi njihovo izumiranje (Maletić i sur. 2018.). Dok neki izvori tvrde da je u Hrvatskoj početkom 19. stoljeća postojalo više od 400 različitih autohtonih sorata (Bulić 1949.), danas ih nalazimo gotovo tri puta manje, dok je samo mali dio autohtonih sorata gospodarski značajan (Marković i sur. 2014.). U primorskom dijelu Hrvatske, autohtone sorte su vrlo zastupljene i čine 90 % površina pod vinovom lozom (Pejić i sur.

1998.). U kontinentalnom dijelu autohtoni sortiment ima tek simboličnu ulogu, uzgaja se na svega 5 % površina (Vončina i sur. 2011.). Dugi niz godina suočeni smo s erozijom autohtonog sortimenta zbog povećanog uzgoja introduciranih sorata, tome doprinosi i nedostatak kvalitetnog sadnog materijala. Situacija se mijenja na bolje u korist autohtonih sorata, te se posljednjih godina sve veća pažnja pridaje upravo njihovoj revitalizaciji (Poljuha i sur. 2010.). Rad na klonskoj selekciji i procjeni sanitarnog statusa autohtonih sorata započeo je prije dvadesetak godina. Od 2003. godine Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu provodi individualnu klonsku selekciju na 10 autohtonih sorata i sorti 'Graševina'. Rezultat toga je certificirani sadni materijal 11 autohtonih sorata uz sortu 'Graševina' dostupnih za tržište s ukupno 34 genotipa (Preiner i sur. 2022.).

3.3.1. Otkriveni virusi vinove loze u Republici Hrvatskoj

U prošlosti većinu nasada vinove loze na području Hrvatske činio je autohtoni sortiment, što se kroz povijest promijenilo (Maletić i sur. 2018.). Jedan od glavnih problema zbog kojeg dolazi do nedostatka autohtonih sorata u proizvodnji je nedostatak zdravstveno ispravnog sadnog materijala. Na jedinkama autohtonog sortimenta otkrivena je visoka učestalost virusnih infekcija i kao takve nisu pogodne za proizvodnju sadnog materijala. Zbog nedostatka jedinki slobodnih od virusa za podizanje nasada nerijetko se koristi neprovjereni sadni materijal (Poljuha i sur. 2010.). Kako bi se spriječila ovakva praksa, posljednjih dvadesetak godina provode se brojna istraživanja diljem Hrvatske, prilikom čega se autohtone sorte testiraju na prisutnost virusa i traže se jedinke bez virusa koje bi kasnije mogle poslužiti kao materijal za razmnožavanje.

Istraživanjem provedenim od strane autora Vončina i sur. (2019.), na 14 autohtonih sorata vinove loze, ukazuje na prisutnost 8 virusa vinove loze: GLRaV-3, GLRaV-1, GLRaV-2 (uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1, 2 i 3), GVA (A- virus vinove loze), GFkV (virus šarene pjegavosti lista) GFLV (virus lepezastog lista vinove loze), ArMV (virus mozaika gušarke) i GVB (B-virus vinove loze) na području Dalmacije. Cilj istraživanja bio je pronaći trsove bez virusa koji bi poslužili kao materijal za proizvodnju certificiranog sadnog materijala. Isti autori kao najzastupljenije viruse na području Dalmacije navode GLRaV-3, GLRaV-1 i GVA viruse. Od 1 116 testiranih trsova, 91 % je zaražen nekim od virusa. Od osam sorata: 'Babica', 'Babić', 'Dobričić', 'Glavinuša', 'Ljutun', 'Mladenka', 'Ninčuša' i 'Vlaška', nije pronađena niti jedna zdrava biljka, dok je kod sorata 'Pošip', 'Plavac mali', 'Maraština' i 'Vugava' pronađen mali broj jedinki bez virusa. Visoki postotak bezvirusnih trsova pronađen je kod sorata 'Grk' i 'Plavina'. Zamijećen je visoki stupanj zaraze mješovitim infekcijama, gdje je detektirana zaraze s dvije, tri, u nekim slučajevima i četiri vrste virusa. Kako navode autori Vončina i sur. (2019.), najzastupljeniji virus na području Dalmacije je GLRaV-3, što potvrđuju i prethodna istraživanja provedena od strane Karoglan Kontić i sur. (2009.). Iz rezultata je vidljivo kako je u priobalnom području vrlo teško pronaći jedinke bez virusne zaraze, što se

može zaključiti tek nakon provedenog testiranja na viruse jer većina zaraženih jedinki ne pokazuje simptome zaraze virusima.

Virusna oboljenja nisu zaobišla niti vinograde Istre, što dokazuju Poljuha i sur. (2010.). Od 18 autohtonih sorti sa 781 uzorkom prikupljenim na 41 lokaciji diljem Istre pronađeni su virusi s postotkom zaraženosti: GFLV (23,9 %), GLRaV-1 (17,2 %) i GLRaV-3 (69,1 %). Većina testiranih sorata bila je zaražena. Uzorci su prikupljeni u vinogradima starijima od 40 godina, gdje postoji mogućnost da je do zaraze došlo zbog načina razmnožavanja vinove loze, bez sanitarne kontrole matičnih trsova. Učestalost zaraze virusima veća je na područjima intenzivne proizvodnje od onih na geografski izoliranim lokacijama (Poljuha i sur. 2010.).

Obrnuti slučaj nalazimo u ostatku Hrvatske koji su istražili Karoglan Kontić i sur. (2009.). Do veće pojave učestalih zaraza najčešće dolazi na izoliranim područjima uzgoja s vrlo malim populacijama. Karoglan Kontić i sur. (2009.) pokreću masovnu selekciju sa sanitarnom selekcijom 21 gospodarski važne sorte Hrvatske ('Debit', 'Lasina', 'Plavina', 'Babica', 'Crljenak kaštelanski', 'Dobričić', 'Glavinuša', 'Ljutun', 'Mladenka', 'Ninčuša', 'Vlaška', 'Malvasija dubrovačka', 'Plavac mali', 'Cipar', 'Gegić', 'Petovka', 'Topol', 'Žlahtina', 'Graševina', 'Kraljevina' i 'Škrlet'). U Dalmaciji, postotak trsova slobodnih od testiranih virusa iznosio je 11 %, u sjevernom dijelu primorske Hrvatske 30 %, dok je kontinentalni dio posjedovao najveći postotak biljaka slobodnih od testiranih virusa s više od 50 % testiranih trsova. Istraživanje ukazuje na veliku prisutnost zaraze virusima i vrlo malu pojavu nezaraženih trsova, osobito u primorskom dijelu. Najrašireniji virus u Dalmaciji je GFLaV-3, dok u kontinentalnom dijelu prevladava GLRaV-1, koji se općenito navodi kao češći virus u sjevernim vinogradarskim regijama (Karoglan Kontić i sur. 2009.). Oba virusa pripadaju u viruse uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 i 3, koji su jedni od gospodarski najpoznatijih virusa. Kao virusi koji su najmanje zastupljeni navedeni su GFLV i ArMv te je utvrđen visoki stupanj mješovitih infekcija (zaraza s dva ili više virusa). Pronađeni su zdravi trsovi sorata 'Graševine', 'Kraljevine' i 'Žlahtine' koji pokazuju dobre predispozicije za individualnu klonsku selekciju, dok je za najvažniju crnu autohtonu sortu 'Plavac mali' pronađen mali broj jedinki slobodnih od testiranih virusa.

'Plavac mali' pokazuje visoku stopu zaraze virusima te posjeduje i višestruke, mješovite infekcije (Vončina i sur. 2009.; Karoglan Kontić i sur. 2009.). Isti autori pronalaze jedinke 'Plavca malog' zaražene GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, GFLV i GFkV. Zbog visoke stope zaraženosti sorte 'Plavac mali', Hančević i sur. (2015.) po prvi puta provode sanaciju tijekom koje je praćen rast 'Plavca malog' u *in vitro* uvjetima prilikom čega su dobiveni klonovi bez virusa. Za dobivanje bezvirusnih jedinki korištena je kultura vrhova izdanaka u kombinaciji s termoterapijom.

Jedno od najnovijih istraživanja na autohtonim sortama rađeno je na 'Plavcu malom' od strane Čarija i sur. (2022.), kada je ispitivana prisutnost 16 virusa na navedenoj sorti. Utvrđena je prisutnost sljedećih virusa: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GFLV, ArMV, GVA, GVB, GVG, GVH (H-virus vinove loze), GVI (I-virus vinove loze), GVJ (J-virus vinove loze), GFkV, GRSPaV (Virus povezan s jamičavosti drva *Rupestris-a*), GPGV (Virus Pinota sivog), GBV-1 i GRBV (*grapevine red blotch virus*). Neki od detektiranih virusa ovim istraživanjem na 'Plavcu malom' su u novije vrijeme otkriveni *Vitivirusi* vinove loze (Maree i sur. 2020.). Utvrđeno je loše zdravstveno stanje sorte na terenu i pronađen je nezanemarivo veliki postotak zaraženih biljaka različitim virusima. Učestala je pojava jedinki s mješovitom zarazom, te je gotovo svaki testirani klon posjedovao GLRaV-3 (85,71 %). Nakon njega najzastupljeniji virus bio je GVA. Isto navode Vončina i sur. (2021.) i zaključuju da je najviše jedinki sorte 'Plavca malog' u primorskoj Hrvatskoj zaraženo GLRaV-3. Na pojedinim lokacijama uzgoja, ulogu najzastupljenijeg virusa preuzima GVA. Isti autori testirali su jedinke 'Plavca malog' na prisutnost novog badnavirusa vinove loze 1 (GBV-1). Novo zastupljeni virus pronađen je na nekoliko lokacija na otocima, Hvar, Vis i Brač (Čarija i sur. 2022.).

3.3.2. Revitalizacija autohtonog sortimenta u Republici Hrvatskoj

Autohtone sorte vinove loze u Hrvatskoj najčešće se razmnožavaju vegetativnim razmnožavanjem, problem se javlja kod nedostatka zdravog sadnog materijala. Zbog toga proizvođači posežu za sadnim materijalom iz različitih izvora, koji najčešće nije zdravstveno ispravan (Jagunić i sur. 2022.). Takav pristup uvjetuje podizanje novih mladih vinograda, koji od samog početka nose neku vrstu biljnih bolesti.

Dolaskom filoksere uništeni su vinogradi autohtonih sorata, što je rezultiralo korištenjem necertificiranog sadnog materijala i uvođenjem novih introduciranih sorti i podloga. Rezultat toga doveo je do suzbijanja filoksere, ali i do stvaranja pogodnih uvjeta za razvoj virusnih bolesti, unesenih na područje Hrvatske (Vončina i sur. 2019.). Dolaskom novih sorata proizvodnja cijepova autohtonog sortimenta je u potpunosti zapostavljena. Aktivnom državnom politikom koja potiče sadnju trajnih nasada i pojačanom popularizacijom autohtonog sortimenta, uz niz projekata koji su provedeni s ciljem revitalizacije i zaštite autohtonih sorata, dolazi se do povećane proizvodnje cijepova autohtonih sorata vinove loze. Andabaka i sur. (2011.) proveli su istraživanje o revitalizaciji, zaštiti i popularizaciji autohtonog sortimenta vinove loze, te su sagledali proizvodnju cijepova autohtonih sorata u rasponu od 6 godina. Godine 2004. proizvedeno je ukupno 3.651.157 cijepova, dok je vrhunac proizvodnje dosegnut 2007. godine sa 9.326.573 cijepova. Posljednje dvije godine istraživanja (2005. i 2006.), proizvodnja je pala. Vidljivo je da trend proizvodnje cijepova autohtonih sorata varira, ali je zasigurno došlo do buđenja svijesti proizvođača i do povećane sadnje nasada autohtonih sorata. Porastom proizvodnje cijepova raste i potražnja za različitim autohtonim sortama, te se postupno uvode „nove“, stare autohtone sorte u proizvodnju cijepova vinove loze. Najveća potražnja tržišta je za cijepovima 'Plavca malog' i

'Malvazije istarske' (Andabaka i sur. 2011.). Nakon ove dvije tradicionalno najpopularnije sorte koje zauzimaju i najveće površine pod vinovom lozom slijede sorte koje su posljednjih godina doživjele gospodarsku revitalizaciju. To su sorte 'Debit', 'Plavina', 'Babić', 'Maraština', 'Pošip', 'Žlahtina', 'Crljenak kaštelanski', 'Malvazija dubrovačka' i 'Škrlet' (Andabaka i sur. 2011.).

Od 2003. godine Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu provodi individualnu klonsku selekciju na pojedinim sortama vinove loze. Do sada je postupak selekcije završen na 11 autohtonih sorata i sorti 'Graševina' s ukupno 34 klona. Sorte na kojima je završena selekcija su: 'Debit', 'Graševina', 'Grk', 'Kraljevina', 'Maraština', 'Moslavac', 'Plavac mali', 'Plavina', 'Pošip', 'Škrlet' i 'Vugava' (Preiner i sur. 2022.). Krajnji rezultat individualne klonske selekcije navedenih autohtonih sorata i sorte 'Graševina' je „Katalog registriranih klonova sorata vinove loze Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu“. Autori kataloga Preiner i sur. (2022.) navode klonove svake sorte na kojoj je završena klonska selekcija, uz opise ampelografskih i proizvodnih karakteristika klonova. Isti autori navode kako su u sklopu projekta „Novi početak za stare Hrvatske sorte vinove loze“ podignuti matični nasadi najviše kategorije sadnog materijala.

3.4. Virusi vinove loze

Vinova loza je kultura koju napadaju različite bolesti i štetnici. Najpoznatije bolesti vinove loze su gljivične bolesti, odmah nakon njih dolaze virusi vinove loze. Virusi su mali obligatni intracelularni paraziti koji sadrže RNA (Ribonukleinska kiselina) ili DNA (Deoksiribonukleinska kiselina) genom obavijen zaštitnim proteinskim omotačem koji je kodiran virusom (Gelderblom 1996.). Specifični su biljni patogeni koji se nakon infekcije počinju sistematično širiti po biljci i vrlo se lako mogu prenijeti sa zaraženih biljaka na zdrave (Mullins i sur. 1992.). Biljni virusi štetno djeluju na smanjenje prinosa, kvalitetu ploda, vigor biljke i najčešće skraćuju vijek trajanja nasada vinove loze (Vončina 2021.). Mogu negativno utjecati na sadržaj šećera, kiselost mošta, boju bobica, otpornost na biotski i abiotski stres (Karoglan Kontić i sur. 2009.). Do danas je u svijetu otkriveno čak 86 virusa koji mogu parazitirati unutar vinove loze (Martelli 2018.; Fuchs 2020.). Neki od njih zastupljeni su gotovo u cijelom svijetu kao kozmopolitski organizmi, dok su pojedini zastupljeni u ograničenim područjima, ovisno o klimi i vrsti biljke koju parazitiraju. Vinova loza je kultura koju parazitira najveći broj biljnih virusa, međutim nisu svi virusi od velike gospodarske važnosti (Vončina 2021.).

3.4.1. Gospodarski značajni virusi vinove loze

Samo se nekoliko vrsta virusa smatra gospodarski značajnima kao što su virusi skupine uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1, 2 i 3 (GLRaV-1, GLRaV-2 i GLRaV-3), virusi uzročnici infektivne degeneracije (GFLV i ArMV) i virusi naboranosti drva vinove loze (GVA, GVB i GRSPaV) (Ivić i Fazinić 2011.; Vončina 2021.). Specifični su zbog svoje raširenosti, potencijala štetnosti i načina širenja ali i simptoma koje uzrokuju na vinovoj lozi (Tablica 3.4.1.1.).

Tablica 3.4.1.1. Gospodarski značajni virusi vinove loze i bolesti koje uzrokuju (Ivić i Fazinić 2011.).

Engleski naziv virusa	Kratica (akronim)	Hrvatski naziv virusa	Bolest koju virus uzrokuje
<i>grapevine fanleaf virus</i>	GFLV	virus lepezastog lista vinove loze	infektivna degeneracija
<i>arabis mosaic virus</i>	ArMV	virus mozaika gušarke	infektivna degeneracija
<i>grapevine leafroll-associated virus 1</i>	GLRaV-1	uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 1	uvijenost lista
<i>grapevine leafroll-associated virus 2</i>	GLRaV-2	uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 2	uvijenost lista
<i>grapevine leafroll-associated virus 3</i>	GLRaV-3	uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 3	uvijenost lista
<i>grapevine virus A</i>	GVA	a-virus vinove loze	naboranost drva
<i>grapevine virus B</i>	GVB	b-virus vinove loze	naboranost drva
<i>grapevine Rupestris stem pitting-associated virus</i>	GRSPaV	virus povezan s jamičavosti drva rupestris-a	naboranost drva

3.4.2. Mjere suzbijanja virusa vinove loze

Za većinu gljivičnih bolesti vinove loze postoje mjere suzbijanja i moguće je ozdraviti zaražene jedinke od pojedine gljivične bolesti. Isto nije moguće kada se radi o virusnim oboljenjima zbog toga što jednom zaražena biljka virusom, ostaje trajno zaražena i trajni je izvor zaraze (Vončina 2021.). Širenju virusnih bolesti najviše doprinosi vegetativni način razmnožavanja vinove loze i sanitarno neispravni sadni materijal (Jagunić i sur. 2022.). Zbog toga se za suzbijanje ove vrste biljnih parazita najčešće primjenjuju preventivne mjere za ograničavanje njihove prisutnosti prilikom razmnožavanja u sadnom materijalu (Fuchs 2020.).

Prema Fuchs (2020.), upravljati virusnim bolestima u postojećim vinogradima moguće je uz kontrolu inokuluma virusa na način da se pravovremeno detektiraju zaraženi trsovi i eliminiraju isti. U slučaju da se zaraženi trsovi ne uklone oni ostaju trajni izvor inokuluma i vrše daljnju zarazu. Jedna od preventivnih metoda koja može biti primjenjiva za sprečavanje pojave virusnih oboljenja je pravovremena kontrola i suzbijanje vektora koji prenose bolesti, poput štitašnih uši i nematoda (Vončina 2021.). Praćenje pojava simptoma virusa na trsu vinove loze može poslužiti kao orijentir pojave virusa. Problem je vrlo je česta pojava maskiranih simptoma na vinovoj lozi, prilikom čega se ne može pravovremeno ocijeniti da se radi o virusu. Karakteristični simptomi za pojedine viruse često se mogu zamijeniti simptomima nekih drugih štetnika ili nedostatkom pojedinog elementa u tlu, te se ne može sa sigurnošću odrediti radi li se o virusu. Nerijetko se može detektirati i mješovita zaraza virusom, što znači da je jedinka zaražena s dvije ili više vrsti virusa.

3.4.3. Metode detekcije virusa vinove loze

Metode primjenjive za detekciju biljnih virusa dijele se na: biološke (cijepjenje, mehanička inokulacija), serološke (ELISA) i molekularne (PCR, HTS) (Jagunić 2023.). Najčešće su primijenjene metode: laboratorijske metode ELISA kao enzimski imunotest na čvrstoj fazi (eng. *enzyme-linked immuno-sorbent assay*) i PCR metoda lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*).

Dvije su vrste protokola koji se temelje na metodi PCR, dijele se na: konvencionalne (koje zahtijevaju vizualizaciju amplificiranih PCR produkata na agaroznom gelu) i na kvantitativne PCR metode u realnom vremenu (eng. *real-time or quantitative PCR*), u kojima se proizvodnja DNA prati fluorometrijskim mjerenjem (Rowhani i sur. 2017.). RT-PCR (eng. *reverse transcription-polymerase chain reaction*) metoda je pogodna za detekciju ako ne postoji velika količina biljnog materijala za testiranje, za reakciju su potrebne vrlo male količine mRNA. Tehnika bazirana na molekulama kao što je PCR može smanjiti vrijeme potrebno za dijagnozu biljnih bolesti u usporedbi s klasičnim testovima (Schaad i sur. 2002.). Osjetljivost metode RT-PCR varira ovisno o biljnoj vrsti. Smatra se najosjetljivijim testom za

detekciju virusnih oboljenja (Mekuria i sur. 2003.; Matic i sur. 2009.). RT-PCR kao kombinirana metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom zasniva se na izolaciji RNA iz zaražene biljke koja se potom prepisuje u cDNA (eng. *complementary DNA*) i umnaža se u lančanoj reakciji polimerazom, specifičnim početnicama za svaki virus. Na dobivenim umnoženim molekulama provodi se elektroforeza u agaroznom gelu (Pavletić 2019.).

3.5. Metode za dobivanje biljaka slobodnih od virusa

Prema Jelaski (1994.) poznato je pet metoda kojima je moguće iz virusne biljke dobiti biljni materijal bez virusa. To su toplinski postupak zvan termoterapija, kultura meristema, kombinacija kulture meristema i toplinskog postupka, stvaranje adventivnih izdanaka i dobivanje iz njih kulture meristema i cijepjenje meristema na bezvirusne podloge *in vitro* (mikrocijepjenje). Kao jedna od novijih metoda spominje se krioterapija (Bettoni i sur. 2016.). Panattoni i sur. (2013.) navode kako se virusi vinove loze mogu eliminirati kulturom tkiva, termoterapijom i kemoterapijom kao novi način za dobivanje biljaka slobodnih od virusa.

Termoterapija je tretman koji se provodi na biljci u smislu izlaganja biljaka povišenim temperaturama od 35 do 45 °C, koje čine granice fiziološke tolerancije (Panattoni i sur. 2013.). Dužina trajanja izlaganja povišenim temperaturama ovisi o vrsti biljke, ali i kombinaciji virusa (najčešće 4 – 6 tjedana) (Wang i sur. 2018.). Izlaganjem biljke visokim temperaturama, ujedno se izlaže i virus. Vrlo je često primijenjena metoda u kombinaciji s kulturom vršnog meristema. U tom slučaju prvo se provodi termoterapija oboljelih biljaka te se zatim unose vršni meristemi u *in vitro* kulturu. (Wang i sur. 2018.). Prema Bettoni i sur. (2016.), krioterapija se temelji na zamrzavanju biljaka u tekućem dušiku, koji ubija virusom zaražene stanice i omogućuje zdravim stanicama preživljavanje, koje zatim regeneriraju u zdrave biljke. Ovom metodom biljni materijal se uranja u tekući dušik (temperature -196°C), uz kontakt sa krioprotektantima. Marković i sur. (2015.) uspješno su oslobodili jedinke 'Cabernet Sauvignona' od GLRaV-3 metodom krioprezervacije. Dokazano je da ova tehnika rezultira velikim brojem biljaka bez virusa (Panattoni i sur. 2013.). Jedna od novijih metoda ozdravljivanja je kemoterapija. Studije su dokazale da primjena antivirusnih sredstava inhibira sintezu virusne RNA, što smanjuje broj virusnih čestica otpuštenih iz zaraženih stanica i omogućava stvaranje površine bez virusa (Wang i sur. 2018.). Kao antivirusno sredstvo koristi se ribavirin (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-karbosamid) (Panattoni i sur. 2013.). Ovi načini eliminacije virusa imaju i neke negativne strane. Termoterapija uzrokuje toplinski stres na eksplantatima, dok je kultura meristemskog vrha vrlo zahtjevna tehnika koja može dovesti do somaklonskih varijabilnosti (Skiada i sur. 2013.). Najučestalija metoda za dobivanje bezvirusnih biljaka je kultura vršnog meristema, uz nju se koriste i druge, gore navedene metode.

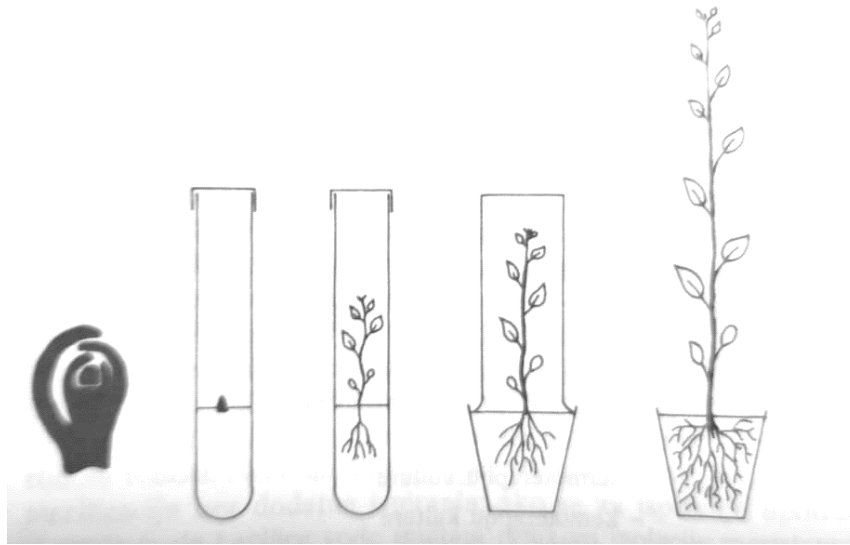
3.5.1. Kultura biljnog tkiva

Kultura biljnog tkiva, metoda je koja se temelji na izolaciji malih dijelova biljaka, poput vegetacijskih vrhova, meristema i somatskih embrija koji se uzgajaju na umjetnim hranidbenim podlogama u kontroliranim uvjetima (Hollings 1965.). Najpoznatija je metoda za regeneraciju biljaka koja se koristi za ozdravljanje biljnih vrsta od virusa. Kontrolirani uvjeti osiguravaju biljkama sve potrebno za njihov rast i razvoj, uz hranidbenu podlogu koja predstavlja medij za uzgoj kulture.

3.5.2. Kultura meristema kao metoda ozdravljanja od virusa

Jedna od metoda kulture tkiva je kultura vršnog meristema (vegetacijskog vrška), koja se sastoji od izolacije jednog vršnog meristema s pridruženim jednim ili više parova primordijalnih listova (Jelaska 1994.). Kultura meristema (Slika 3.5.2.1.) kao tehnika kulture tkiva smatra se učinkovitim načinom za eliminaciju različitih vrsta biljnih virusa (Panattoni i sur. 2013.; Fayek i sur. 2009.). Jelaska 1994. (prema Morel i Martin 1952.), navodi da su navedeni autori prvi dokazali kako se kulturom meristema može od zaražene biljke dobiti zdrava biljka, oslobođena od virusa. Isti autor navodi kako je primjenom kemoterapije i termoterapije do sada postignut djelomični uspjeh u suzbijanju biljnih virusa dok se jedina djelotvorna metoda smatra kultura tkiva. Novija istraživanja preporučuju kombinaciju kulture meristema s termoterapijom, kako bi se postigao bolji uspjeh eliminacije virusa (Marković i sur. 2021.). Hančević i sur. (2015.) uspješno su eliminirali GLRaV-3 i GFkV iz klonova autohtone sorte 'Plavca malog' termoterapijom i uzgojem vrhova izdanaka u kulturi tkiva.

Kultura meristema s ciljem sanacije biljaka od virusa provodi se izoliranjem eksplantata meristema (vršni izdanci, pupovi, somatski embriji), radi dobivanja zdrave biljke i postavljanja eksplantata na umjetnu (hranidbenu) podlogu u kontrolirane uvjete (Panattoni i sur. 2013.; Marković i sur. 2021.). Počevši od vegetacijskog vrha izdanaka novu biljku spremnu za sadnju možemo dobiti nakon 1 – 2 mjeseca, dok je kod vršnog meristema, kao početnog eksplantata potrebno nekoliko mjeseci da se dobije nova biljka (Panattoni i sur. 2013., prema Faccioli 2001.). Preporučuje se izolacija eksplantata, u ovom slučaju vršnog meristema u vrijeme aktivnog rasta izdanaka (Jelaska 1994.). Tada je veća mogućnost da uzeti eksplantat neće sadržavati virusne čestice.



Slika 3.5.2.1. Shematski prikaz kulture meristema.

Izvor : (Jelaska 1994.).

Oslobađanje od virusa metodom kulture tkiva zasniva se na spoznaji da vršno meristemsko tkivo izdanaka i korijenja biljaka sadrži vrlo malu koncentraciju ili uopće ne sadrži virusne čestice, iako je biljka u konačnici zaražena virusom (Jelaska 1994.). Smatra se da koncentracija virusa nije ujednačena u cijeloj biljci. Fayek i sur. 2009. navode (prema Gomes 2004.) da je moguće ozdraviti biljnu vrstu kulturom vršnog meristema, zbog činjenice da vršni meristem i prvi set primordijalnih listova u izdanku nisu povezani s provodnim sustavom biljke te iz tog razloga nisu kontaminirani virusom koji putuje kroz biljku. Optimalna veličina izoliranog tkiva meristema je 0,2 – 0,7 mm, ukoliko se želi postići eradikacija virusa i dobiti zdravi početni eksplantat (Panattoni i sur. 2013.). Ova spoznaja omogućava primjenu tehnike izolacije vršnog meristema kao primjenjivu metodu za ozdravljanje biljaka od virusa. Fayek i sur. (2009.) proveli su istraživanje čiji je cilj bio detekcija GLRaV-3 i GFLV u vinovoj lozi te proizvodnja biljaka slobodnih od testiranih virusa kulturom vršnih meristema u kulturi tkiva. Došli su do zaključka da biljke dobivene iz meristema veličine 1 mm imaju veću stopu zaraženosti virusima od onih dobivenih iz meristema veličine 0.5 mm. Fayek i sur. 2009. (prema Faccoli i Marano 1998.) navode kako je veličina meristema presudna je za uspjeh ozdravljanja biljaka tehnikom vršnog meristema. Isti autori zaključuju da što je veći izolirani eksplantat meristema, veći je broj regeneriranih biljaka, prilikom čega je broj biljaka bez virusa obrnuto proporcionalan, vrlo je malo biljaka oslobođenih od virusa. Veličinu uzorkovanog vršnog meristema nije uvijek moguće odrediti, kod nekih sorata kao što je 'Plavac mali', teško je izolirati vrh meristema zbog dlakavih vrhova izboja, zbog toga je izolirani uzorak nerijetko veći (Hančević i sur. 2015.).

Marković i sur. (2021.) prate preživljavanje i regeneraciju 15 autohtonih sorata vinove loze zaraženih različitim virusima u *in vitro*. Isti autori zaključuju da se bolji uspjeh uspostave

populacije pokazao kada je uzet eksplantat u fenološkoj fazi nakon cvatnje, što rezultira većim postotkom preživljavanja. Marković i sur. (2021.) proveli su uzorkovanje meristema u fenološkoj fazi nakon cvatnje (BBCH 71) i dobili značajno veći postotak preživljavanja biljaka u odnosu na one nastale iz materijala koji je uzorkovan u fazi rasta ili prije cvatnje. Vršni meristemi bili su veći u fazi prije cvatnje te je bilo lakše izolirati meristem, što potvrđuju autori Bota i sur. (2014.).

3.5.3. Aklimatizacija

Aklimatizacija je metoda postupnog uvođenja biljaka iz *in vitro* u uvjete *in vivo*. Provodi se nakon što *in vitro* biljke razviju zadovoljavajući korijen i nadzemnu masu. Njome se biljke dobivene u *in vitro* uvjetima postupno prenose iz epruvete (koja predstavlja kontrolirane uvjete) i hranidbenog medija u kojemu su rasle, u supstrat i vanjske uvjete. *In vitro* uvjeti razlikuju se od *in vivo* uvjeta, stoga je biljke potrebno prilagoditi novom načinu uzgoja (Lewandowski 1991.). Biljke dobivene *in vitro* načinom razmnožavanja rastu u strogo kontroliranim uvjetima (Hazarika 2003). Uzgajane su unutar epruvete, uz kontroliranu temperaturu, vlagu zraka i strogo zaštićene od štetnika i uzročnika bolesti (Pospóšilová 1999.). *In vitro* biljke imaju slabije razvijenu kutikulu i sklone su isušivanju nakon što uđu u proces aklimatizacije. Hranidbeni medij osigurava biljkama potrebna hranjiva, hormone i vlagu, zbog toga takve biljke uglavnom nisu u potpunosti fotosintetski aktivne (Hazarika 2003.). Primjena aklimatizacije je ograničena visokim postotkom izgubljenih biljaka prilikom prenošenja biljaka iz *in vitro* u *in vivo* način uzgoja (Pospóšilová 1999.). Kako ne bi došlo do velikih gubitaka eksplantata, tijekom postupka aklimatizacije potrebno je biljke postupno uvoditi u nove uvjete uzgoja te ih i dalje održavati u djelomično kontroliranim uvjetima, dok ne razviju sve potrebne fiziološke i anatomske karakteristike za samostalni rast i razvoj.

3.6. Utjecaj virusa i genotipa na rast i razvoj u *in vitro* kulturi

Vinova loza kultivirana je biljka adaptabilna na različite uvjete uzgoja. Kada se govori o kulturi tkiva, svi genotipovi vinove loze nisu jednako adaptabilni na uvjete uzgoja u kulturi tkiva. Pojedine sorte uspijevaju bolje u uvjetima *in vitro* od drugih (Martinelli i sur. 1996.; Henry i sur. 1994.). Prema Jelaska (1994.) genotip iste vrste može imati značajan utjecaj na uspješnost uzgoja u kulturi tkiva. Različito adaptabilne sorte pokazuju različite rezultate prilikom unosa u kulturu, ali i daljnjeg održavanja u kulturi. Jedna od sorata koja je izuzetno adaptabilna na uvjete kulture tkiva je sorta 'Portan', koja se radi spomenute adaptabilnosti koristi kao „model biljka/kultivar“ za ispitivanje određenih uvjeta u kulturi tkiva (Marković i sur. 2013.). Kada je testiranje protokola napravljeno samo na jednoj sorti ili kultivaru, potrebno ga je testirati za svaku drugu sortu od interesa da bi on postao učinkovit (Marković i sur. 2013.).

Uz utjecaj genotipa na rast u *in vitro* kulturi, značajnu ulogu imaju virusi vinove loze. Virus vinove loze utječu na rast, razvoj i regeneraciju biljke domaćina, kako u vanjskim uvjetima uzgoja tako i u kontroliranim *in vitro* uvjetima (Marković i sur. 2021.). Različite vrste virusa pokazuju različiti utjecaj na uzgoj vinove loze. Dokazano je da biljke koje posjeduju virus imaju niži sadržaj vode u lisnom tkivu i stabljici te manju mogućnost proizvodnje epikutikularnog voska, što može dovesti do smanjenja preživljavanja oboljelih biljaka u uvjetima *in vitro* (Bota i sur. 2014., prema Pâques and Boxus 1987.; Majada 2001.), kao i do smanjenja fotosintetske aktivnosti biljaka.

Marković i sur. (2014.) provode istraživanje na osam autohtonih hrvatskih sorata, iz rezultata istraživanja vidljiv je utjecaj sorte na adaptabilnost u *in vitro* uzgoju. Pojedine sorte imale su vrlo slabi rast u *in vitro* uvjetima, dok su neke sorte poput 'Plavca malog' pokazale izuzetan rast. Sorte su bile zaražene virusima vinove loze koji su dodatno utjecali na rast i razvoj jedinki. Tako je preživljavanje kod sorte 'Plavac mali' bilo iznad 90 % dok je za sorte 'Debit', 'Grk', 'Plavina' i 'Lasina' iznosilo oko 50 %. Najslabije rezultate preživljavanja dala je sorta 'Grk'. Rezultati su pokazali razliku između jedinki slobodnih od virusa i zaraženih jedinki u duljini izboja, broju nodija, ali i u samom preživljavanju u kulturi tkiva.

Utjecaj genotipa na regenerativnu sposobnost meristema vinove loze prikazan je istraživanjem provedenom od strane autora Smerea i sur. (2010.) na 11 različitih genotipova vinove loze, na tri različita MS medija (Murashige i Skoog 1962.). Provedena je regeneracija biljaka u *in vitro* uvjetima regeneracijom meristema. Odstupanja u sposobnosti regeneracije primarno su ovisila o genotipu. Uz genotip, odstupanja regeneracije ovise i o virusnoj infekciji, te je tako kod istog genotipa dolazilo do različite stope regeneracije. Korišteni eksplantati bili su vegetacijski vrhovi vinove loze zaraženi nekim od virusa: GFkV, GFLV, GVA, GVB, GLRaV-1 i GLRaV-3. Krajnji rezultati pokazao je da brzina regeneracije meristema varira ovisno o genotipu. Dolazilo je do variranja kod regeneracije u okviru jednog genotipa što ukazuje na utjecaj fitosanitarnog statusa biljke.

Zbog visoke stope zaraženosti sorte 'Plavac mali', Hančević i sur. (2015.) prvi puta provode sanaciju tijekom koje je praćen rast u *in vitro* uvjetima i dobiveni su bezvirusni klonovi. Za dobivanje jedinki bez virusa korištena je kultura vrhova izdanaka u kombinaciji s termoterapijom. Uspješno su eliminirali GLRaV-3 i GFkV. Tijekom sanacije praćen je rast u *in vitro* uvjetima i potvrđen je utjecaj genotipa na rast i razvoj u *in vitro*. Utjecaj sanitarnog statusa na rast i razvoj kulture meristema uočen je u istraživanju koje provode Marković i sur. (2021.). Navedeni autori prate preživljavanje i regeneraciju 18 autohtonih sorata vinove loze zaraženih različitim virusima. Biljke su se razlikovale u preživljavanju, regeneraciji i ukorjenjivanju, obzirom na virusnu zarazu koju posjeduju. Suprotno očekivanjima, autori zaključuju da genotipovi zaraženi s tri virusa (GLRaV-1, GLRaV-3 i GFLV) pokazuju bolje rezultate umnažanja od genotipova zaraženih s jednim (GLRaV-3) ili dva virusa vinove loze (GLRaV-3 + GLRaV-1).

3.7. Virusi vinove loze otkriveni u novije vrijeme

Novi virusi vinove loze redovito se otkrivaju. Jedni od virusa otkrivenih u novije vrijeme su G-virus vinove loze (GVG), prvi puta pronađen na Novom Zelandu i badnavirus vinove loze 1 (GBV-1), po prvi puta pronađen u hrvatskim autohtonim sortama vinove loze. Ovim istraživanjem utvrđen je utjecaj dva nova virusa vinove loze na rast i razvoj vinove loze u kulturi meristema *in vitro*.

3.7.1. G-virus vinove loze (GVG)

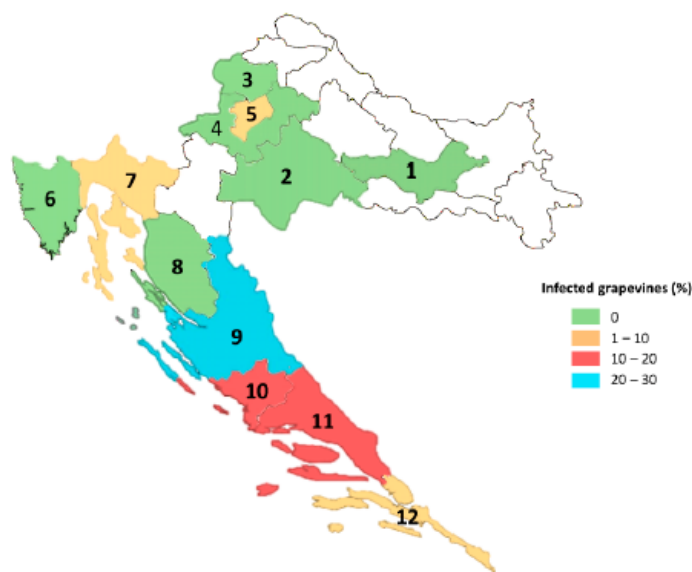
G-virus vinove loze (GVG) identificiran je 2018. godine na području Novog Zelanda (Blouin i sur. 2018.) u sorti 'Chardonnay', jednoj od svjetski poznatih sorata podrijetlom iz Francuske. Prema Blouin i sur. (2018.) nije moguće odrediti točno podrijetlo virusne zaraze, stoga postoji mogućnost da je zaraza donesena uvozom sadnog materijala, ali i da je riječ o novoj infekciji s Novog Zelanda. Iste godine kada je virus pronađen na Novom Zelandu, G-virus vinove loze (GVG) identificiran je u četiri Hrvatske autohtone sorte vinove loze, 'Ljutun', 'Vlaška', 'Babica', i 'Dobričić' podrijetlom iz kaštelanskog kraja (Vončina i Almeida 2018.).

Filogenetskom analizom potvrđena je pripadnost G-virusa vinove loze rodu *Vitivirus* (Blouin i sur. 2018.). Prema Maree i sur. (2020.) *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) priznaje 15 vrsta roda *Vitivirus*. Posljednjih godina otkriveno je nekoliko novih vrsta. Rod je dobio ime po svom domaćinu *Vitis* i pripada porodici *Betaflexiviridae*. Vinova loza smatra se najraširenijim prirodnim domaćinom ovog roda (Debat i sur. 2019.). Vrste roda *Vitivirus* prenose se štitastim ušima iz porodice *Pseudococcida* i *Coccidae* (Diaz-Lara i sur. 2019.).

Istraživanje provedeno na različitim sortama vinove loze u Kaliforniji (Diaz-Lara i sur. 2019.) ukazuje je na prisutnost GVG uz GVH i GVI, što čini treći po redu nalaz GVG u svijetu. Identificiran je GVG na 'Pinotu crnom' i 'Chardonnayu'. Otkrivene su pojedinačne zaraze ovim virusima, ali i mješovite gdje su autori Diaz-Lara i sur. (2019.) u jednoj biljci pronašli tri vrste virusa iz roda *Vitivirus*. Blouin i sur. (2018.) navode da je pojava mješovite infekcije uobičajena u komercijalnim vinogradima Kalifornije.

Dodatna terenska istraživanja koja su proveli Jagunić i sur. (2022.) na 4327 trsova vinove loze iz kontinentalnih i primorskih vinogradarskih regija Hrvatske, potvrđuju visoku zaraženost GVG. Virus je detektiran u 10,5 % testiranih jedinki koje su potjecale iz tri kolekcijska nasada i 77 komercijalnih vinograda. Svi trsovi u kojima je identificiran virus pripadaju autohtonim Hrvatskim sortama. Iz četiri kolekcijska nasada na području Zagreba (kontinentalna Hrvatska) testirano je 878 trsova, od čega je 30 trsova autohtonih sorata dalo pozitivan rezultata na prisutnost GVG. Testirani su i trsovi kolekcijskog nasada u priobalnom

području (Split), gdje je od 105 testiranih jedinki, 5 trsova pozitivno na GVG. Testiranjem provedenim u 93 komercijalna vinograda, 16 kontinentalne regije i 77 priobalnog područja, nije otkriven niti jedan trs zaražen GVG u komercijalnim vinogradima kontinentalnog područja. U priobalnom području virus je identificiran u 421 trsu od testiranih 2903 trsova. Isti autori navode da je najveća zaraza uočena na području Furnaže i Marceline koji pripadaju Splitsko-dalmatinskoj županiji, te na području Paga, Zadarske županije. Najčešće pronađene sorte zaražene virusom su sorte 'Mladenka', 'Vlaška' i 'Paška maraština' (Jagunić i sur. 2022.). Smatra se da je uzrok velike zaraženosti ovih autohtonih sorata, zaraženi sadni materijal. Zbog mješovitih zaraza (zaraza s više različitih virusa) koje nalazimo u svim jedinkama u kojima je identificirana zaraza GVG, nije moguće odrediti točnu simptomatologiju virusa. Zabilježena je prisutnost G-virusa vinove loze u 6 od 12 županija Hrvatske u kojima je provedeno testiranje na GVG (Slika 3.7.1.1.). Najviše zaraženih jedinki pronađeno je u Zadarskoj županiji, slijedi je Šibensko-kninska, Splitsko-dalmatinska, Dubrovačko-neretvanska, Grad Zagreb i na zadnjem mjestu Primorsko-goranska županija (Jagunić i sur. 2022.).



Slika 3.7.1.1. Infekcija G-virusom vinove loze na području Hrvatske. (Brojevima su na karti označene županije). Legenda pokazuje boje s obzirom na postotak zaraze u pojedinoj županiji. (Identifikatori za županije: 1—Požeško-slavonska, 2—Sisačko-moslavačka, 3—Krapinsko-zagorska, 4—Zagrebačka županija, 5—Grad Zagreb, 6—Istarska županija 7—Primorsko-goranska ,8—Ličko-senjska, 9—Zadarska; 10—Šibensko-kninska 11—Splitsko-dalmatinska 12—Dubrovačko-neretvanska)

Izvor: (Jagunić i sur. 2022.).

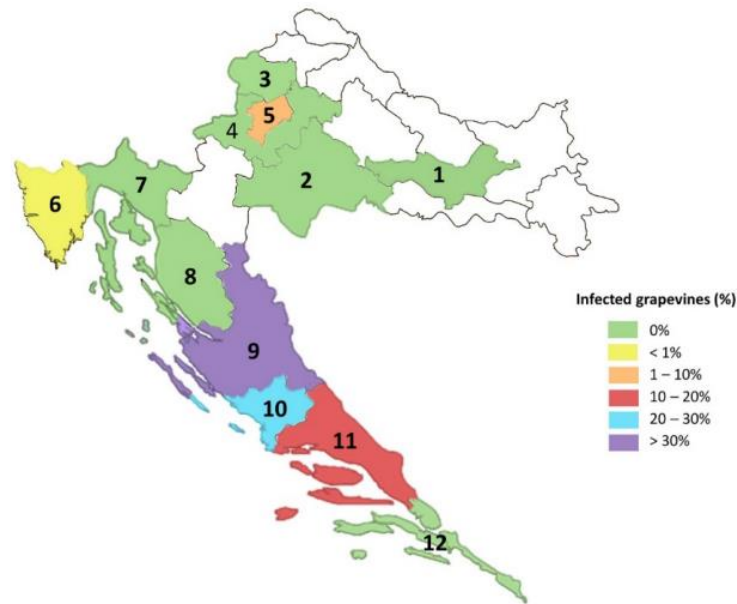
3.7.2. Badnavirus vinove loze 1 (GBV-1)

Istraživanjem koje provode Vončina i Almeida (2018.) na četiri autohtone sorte vinove loze, podrijetlom s područja Kaštela otkriven je novi badnavirus vinove loze 1 (GBV-1). Virus je od testiranih četiri sorata otkriven na dvije autohtone sorte vinove loze. Ovaj virus uz još 67 drugih vrsta virusa pripada rodu *Badnavirus* koji čini jednu od najpoznatijih skupina biljnih virusa.

Poznato je da pripadnici roda *Badnavirus* vrše infekciju na različitim biljnim vrstama u cijelom svijetu, a najviše na kulturama tropskih krajeva poput banana, crnog papra, kakaovca i citrusa (Bhat i sur. 2016.). Kao virusi većinom tropskih kultura rasprostranjeni su u tropskim i umjerenim regijama Afrike, Azije, Europe te Južne i Sjeverne Amerike (Bhat i sur. 2016.). Badnavirusi većinom napadaju biljne vrste koje se razmnožavaju vegetativno. Mogu se prenositi vegetativnim razmnožavanjem, sjemenom i različitim vrstama štitastih ušiju. Simptomi uzrokovani badnavirusima razlikuju se ovisno o biljnoj vrsti koju virus napada, kultivaru, vrsti virusa, ali i uvjetima uzgoja. Simptomi koje uzrokuju virusi ovog roda najčešće dovode do zastoja u rastu cijele biljke, te se javljaju deformacije lišća, klorotične mrlje, nekrotične pruge i smanjenje dužine internodija (Bhat i sur. 2016.).

GBV-1 pronađen je 2018. godine od strane autora Vončina i Almeida (2018.) u dvjema autohtonim sortama 'Ljutun' i 'Vlaška', podrijetlom iz kaštelanskog kraja. Biljni materijal na kojemu je otkriven novi virus uzorkovan je iz kolekcijskog nasada virusa vinove loze u Zagrebu kojeg održava Zavodu za fitopatologiju, Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Kao glavni uzrok širenja ovog virusa u vinogradarstvu smatra se vegetativno razmnožavanje vinove loze.

Novije provedena istraživanja na području kontinentalne i primorske Hrvatske ukazuju na učestalu pojavu zaraženosti trsova vinove loze sa GBV-1 (Jagunić i sur. 2022). U kontinentalnom dijelu zemlje zaraženi trsovi detektirani su u samo dva kolekcijska nasada, dok je u priobalnom području potvrđena zaraza u 30 komercijalnih vinograda i jednom kolekcijskom nasadu. Od ukupno 4302 testirana trsa vinove loze 13,4 % je potvrđeno kao pozitivno na GBV-1. Od toga je 41 % pozitivnih trsova podrijetlom iz kolekcijskih nasada vinove loze i 12,4 % podrijetlom iz komercijalnih vinograda. U kontinentalnom dijelu virusom zaraženi trsovi detektirani su u dvije zbirke vinove loze, ali niti jedan zaraženi trs na tom području nije pronađen u komercijalnim vinogradima. U primorskom dijelu detektirana je zaraza u kolekcijskom nasadu (Split) i u 72 komercijalna vinograda. Autori Jagunić i sur. (2022.) navode kakao je najveća zaraza GBV-1 utvrđena je na lokacijama: Kraljičina plaža (Nin) i Ivan Dolac (otok Hvar), gdje se od 50 testiranih trsova 48 pokazalo pozitivno na GBV-1. Prisutnost virusa potvrđena je u pet županija: Grad Zagreb, Istarska županija, Zadarska, Šibensko-kninska i Splitsko-dalmatinska županija (Slika 3.7.2.1.). Od toga je najveća stopa zaraženosti detektirana u Zadarskoj županiji (Jagunić i sur. 2022).



Slika 3.7.2.1. Infekcija badna virusom vinove loze na području Hrvatske. (Brojevima su na karti označene županije). Legenda pokazuje boje s obzirom na postotak zaraze u pojedinoj županiji. (Identifikatori za županije: 1—Požeško-slavonska, 2—Sisačko-moslavačka, 3—Krapinsko-zagorska, 4—Zagrebačka županija, 5—Grad Zagreb, 6—Istarska županija 7—Primorsko-goranska ,8—Ličko-senjska, 9—Zadarska; 10—Šibensko-kninska 11—Splitsko-dalmatinska 12—Dubrovačko-neretvanska)

Izvor: (Jagunić i sur. 2022.).

Istraživanje koje je provedeno u Rusiji od strane Chirkov i sur. (2022.), ukazuje na mogućnost da vinova loza možda nije primarni domaćin ovog virusa. Autori Chirkov i sur. (2022.) uočili su učestalu pojave zaraze smokve sa GBV-1. GBV-1 uzrokuje bolest mozaika smokve i dovodi do klorotičnih mrlja, uvijenosti lišća i prstenastih pjega kod smokve (Aizitili i sur. 2023.).

3.7.3. Način prijenosa GVG i GBV-1

S ciljem utvrđivanja načina prijenosa GVG i GBV-1 Jagunić i sur. (2022.) provode istraživanje kojim je sagledan način prijenosa GVG i GBV-1 na zdrave jedinke vinove loze. Inducirano su pokušali zaraziti zdrave jedinke na više načina. Autori navode da je vektor kojim je moguće prenijeti viruse na zdrave jedinke vinove loze, lozina štitasta uš (*Planococcus ficus*). Isti autori ispitali su mogućnost prijenosa GVG i GBV-1 sadnim materijalom.

Uspješno je provedeno zeleno cijepljenje s drvenim indikatorom zaraženim GBV-1 i dokazano kako je moguće prenijeti GBV-1 cijepljenjem zaraženog indikatora (plemke) na zdravu podlogu. Biljke zaražene GBV-1 nisu pokazale nikakve simptome zaraze, što ukazuje na mogućnost latentne infekcije. Zelenim cijepljenje uspješno je prenesen GVG na 'Chardonnay' i 'Cabernet Sauvignon'. Simptomi su vidljivi na lišću, slični su simptomima uvijanja lišća vinove loze, pojavilo se žućenje i crvenilo listova. Autori zaključuju kako je GVG i GBV-1 moguće prenijeti sa jednog trsa na drugi cijepljenjem i štitastim ušima kao vektorom (Jagunić i sur. 2022.).

4. Materijali i metode

4.1. Sorte uključene u istraživanje

Istraživanje je provedeno na 10 autohtonih sorata vinove loze: 'Tanetova loza', 'Galac', 'Silbijanac', 'Petovka', 'Gegić', 'Bljuzgavac', 'Krstičevica', 'Pavičić', 'Ninska crvena' i 'Oskorušica'. Sorte uključene u istraživanje, nemaju veliki gospodarski značaj u vinogradarstvu Hrvatske, ali su značajne za pojedina vinogradarska područja Hrvatske. Za četiri sorte prikupljene su reznice dozrele rozgve s po dva trsa od svake sorte, dok su za ostalih 6 sorata prikupljene reznice s jednog trsa zbog ograničenog broja trsova koji su zaraženi s dva nova virusa, GVG (G-virusom vinove loze) i GBV-1 (badnavirusom vinove loze 1). Svaki trs označen je kao zaseban genotip. Sveukupno od testiranih 14 genotipova dokazano je da 7 genotipova posjeduje pojedinačnu zarazu GBV-1, 5 genotipova pojedinačnu zarazu GVG i svega 2 genotipa mješovitu zarazu, što znači da su zaražena s oba virusa (GVG + GBV-1).

'Tanetova loza' smatra se sinonimom sorte 'Vlaška'. Autori Zdunić i sur. (2013.) dokazali su da sorta 'Vlaška' ima isti genotip kao 'Tanetova loza'. Smatra se sortom otoka Visa (Andabaka 2015.). Pretpostavlja se da potječe iz Kaštelanske zagore u Kaštelama (Bulić 1949.). Danas na području Hrvatske možemo pronaći 10,13 ha vinograda pod ovom sortom (Andabaka 2015.).

'Galac' pripada kritično ugroženim sortama Hrvatske prema autorima Maletić i sur. (2015.), čije podrijetlo nije sasvim razjašnjeno. Bulić (1949.) navodi kako su trsovi ove crne sorte pronađeni na području Ravnih kotara. Specifična je po tome što posjeduje funkcionalno ženski cvijet i potrebna joj je druga sorta kao oprašivač. Nikad se nije uzgajala u značajnoj mjeri zbog neredovite rodosti uzrokovane lošom oplodnjom (Maletić i sur. 2015.).

'Silbijanac' pripada kritično ugroženim sortama, danas ju je moguće pronaći u starim vinogradima podregije Hrvatsko primorje (Maletić i sur. 2015.). Bijela je sorta vinove loze, pogodna za uzgoj na različitim tipovima tala. Prema Bulić (1949.) uzgajala se u velikoj mjeri na otoku Silbi prije pojave filoksere.

'Petovka' je sorta čije podrijetlo nije poznato, ali njezin sinonim 'Cetinka' govori nam da je možda nastala na području rijeke Cetine (Maletić i sur. 2015.). Sortu je moguće pronaći na otoku Korčuli i okolnim otocima. Posjeduje veliki potencijal rodosti ali prinost može varirati zbog loše oplodnje koja je uzrok funkcionalno ženskog cvijeta (Andabaka 2015.).

Sorta 'Gegić' rasprostranjena je u najvećoj mjeri na otoku Pagu, može se pronaći i u starijim nasadima Zadarskih vinogorja (Maletić i sur. 2015.). Podrijetlo sorte nije poznato. Grožđe se odlikuje karakterističnom sortnom aromom.

'Bljuzgavac' kao izuzetno stara sorta pripada kritično ugroženim sortama Hrvatske (Maletić i sur. 2015.). Prema Maletić i sur. (2015.) sinonim joj je 'Črnina kesna'. Isti autori navode da je nastala križanjem sorata 'Bratkovina crna' i 'Gyoengy feher'. 'Bljuzgavac' nema veliki značaj u proizvodnji i rijetko se može pronaći u vinogradima.

'Krstičevica' također pripada kritično ugroženim sortama čije podrijetlo nije poznato (Maletić i sur. 2015.). Od davnina je bila rasprostranjena samo na području otoka Visa i Hvara, gdje se danas može rijetko pronaći. Prema starijim zapisima, grožđe ove sorte se u prošlosti prosušivalo te se od njega proizvodio prošek (Maletić i sur. 2015.).

Prema Bulić (1949.) 'Pavičić' je sorta koju nalazimo na području otoka Hvara, Brača i Visa. Poznatije ime sorte je 'Soić'. Prema Maletić i sur. (2015.) sorta je u prošlosti bila poznata po intenzivnoj boji vina, zbog čega se izvozila u Francusku. Većinom se koristila za proizvodnju kupaža vina.

Sorte 'Ninska crvena' i 'Oskorušica' su nakon provedenih genetskih istraživanja ostale bez utvrđenog genetskog podrijetla, smatraju se Hrvatskim autohtonim sortama, ali o njima ne postoje literaturni zapisi.

Radi kontrole rasta i razvoja eksplantata dobivenih metodom vršnog meristema, prije postavljanja istraživanja koje uključuje prethodno navedene genotipove postavljeno je preliminarno istraživanje. Preliminarno istraživanje obuhvaćalo je unos četiri bezvirusna genotipa sorte 'Portan' i pet genotipa iste sorte zaraženih GBV-1 u kulturu tkiva metodom vršnog meristema. Korištena je sorta 'Portan' iz razloga što se pokazala kao izuzetno adaptabilna sorta prilikom uzgoja u kulturi tkiva u prethodnim istraživanjima provedenim od strane Marković i sur. (2013.). Sorta se smatra „model biljka/kultivar“ i često je korištena sorta kod ispitivanja protokola u kulturi tkiva, što je bio i cilj ovog kontrolnog dijela istraživanja.

4.2. Postavljanje pokusa i sanitarni status sorata u istraživanju

Kao ishodišni materijal koristile su se odrvenjele reznice ranije navedenih autohtonih sorata uzetih iz Nacionalne kolekcije autohtonih sorata sa vinogradarsko-vinarskog pokušališta Agronomskog fakulteta u Zagrebu „Jazbina“. Nakon provedenog testiranja na G-virus vinove loze (GVG) i badnavirus vinove loze 1 (GBV-1) i utvrđenoj pojedinačnoj ili mješovitoj zarazi ovim virusima, odabrane sorte uvedene su u istraživanje. Uzorkovanje biljnog materijala provedeno je u dva navrata u razmaku od tri dana (Tablica 4.2.1.). Iz

vinograda su uzorkovani sljedeći genotipovi: 'Oskorušica' 1, 'Oskorušica' 2, 'Tanetova loza' 4, 'Tanetova loza' 2, 'Galac' 2, 'Silbijanac' 1, 'Silbijanac' 2, 'Petovka' 5, 'Petovka' 1, 'Gegić' 2, 'Bljuzgavac' 2, 'Krstičevica' 2, 'Pavičić' 3 i 'Ninska crvena' 6. Drvenaste reznice stavljene su u staklenke s vodom u sobne uvjete. Cilj ovog postupka bio je da reznice razviju mlade izdanke, brže nego u vanjskim uvjetima, čiji će se zatim vršni meristemi unositi u kulturu tkiva. U Tablici 4.2.1. prikazan je sanitarni status uzorkovanih genotipova s brojem uzorkovanih reznica i vremenom uzorkovanja za svaki genotip.

Tablica 4.2.1. Genotipovi vinove loze uključeni u istraživanje i njihov sanitarni status.

Genotip	Sanitarni status	Broj odrvenjelih reznica stavljenih u vodu	Datum stavljanja reznica u vodu
'Oskorušica' 1	GBV-1	12 kom	11.02.22.
'Oskorušica' 2	GBV-1	16 kom	14.02.22.
'Tanetova loza' 4	GBV-1	13 kom	11.02.22.
'Tanetova loza' 2	GBV-1	15 kom	14.02.22.
'Krstičevica' 2	GBV-1	16 kom	14.02.22.
'Pavičić' 3	GBV-1	15 kom	14.02.22.
'Ninska crvena' 6	GBV-1	13 kom	14.02.22.
'Galac' 2	GVG	16 kom	14.02.22.
'Silbijanac' 1	GVG	8 kom	11.02.22.
'Silbijanac' 2	GVG	8 kom	14.02.22.
'Petovka' 5	GVG	10 kom	11.02.22.
'Petovka' 1	GVG	21 kom	14.02.22.
'Gegić' 2	GBV-1 + GVG	14 kom	11.02.22.
'Bljuzgavac' 2	GBV-1 + GVG	2 kom	11.02.22.



Slika 4.2.1. Reznice uzorkovanih genotipova nakon što su stavljene u vodu na pupanje.

Reznice uzorkovanih genotipova s dva do tri pupa stavljene su u vodu na pupanje pri sobnoj temperaturi (Slika 4.2.1.). Nakon pupanja uzimani su vršni izdanci (veličine 10 mm) na kojima je provedena sterilizacija, izvršena izolacija i unos vršnog meristema u uvjete kulture tkiva s veličinom eksplantata od 1 mm. Pojedine sorte brzo su razvile nove izdanke iz pupova, dok je nekima bilo potrebno i do 8 tjedana kako bi razvile izdanke.

4.3. Odabir i priprema hranidbenog medija

Biljni materijal u *in vitro* uvjetima uzgajao se na umjetno pripremljenom hranidbenom mediju (podlozi). Hranidbeni medij sastoji se od: mineralnih soli, (makrohranjiva i mikrohranjiva), ugljikohidrata (saharozu), regulatora rasta (auksini i citokinini) i vitamina (Marković i Preiner 2011.).

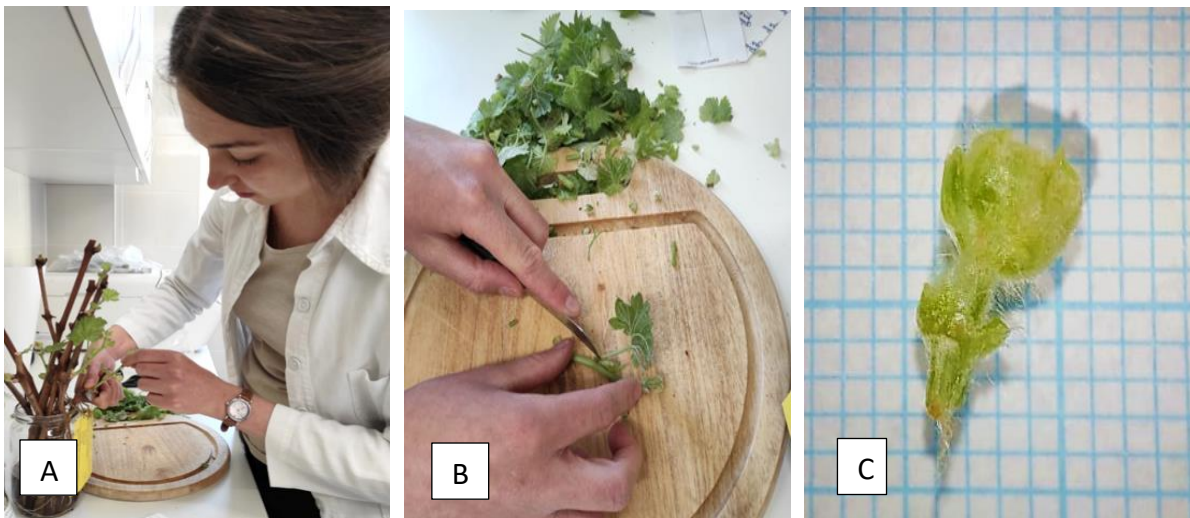
Kako bi pripremili 1 l hranidbenog medija, bilo je potrebno odmjeriti 800 ml redestilirane vode u koju se dodalo 4.4 g MS (Murashige i Skoog medij) hranidbene podloge u prahu. Otopina vode i hranidbene podloge stavljena je na magnetsku miješalicu kako bi se hranidbena podloga otopila. Nakon što se hranidbena podloga otopila dodavali su se potrebni hormoni, ovisno o vrsti hranidbene podloge, te se otopina ulijevala u menzuru kako bi se dolila redestilirana voda do željenog volumena od 1000 ml. Otopina se zatim vratila na magnetsku miješalicu kako bi se izmjerio pH hranidbene podloge. Mjerenje pH vrijednosti provodilo se pH-metrom, kalibrirana elektroda pH metra uranja se u otopinu hranidbene podloge i pH vrijednost se podešavala do željenog iznosa. Prema autorima Marković i Preiner (2011.), pogodna pH vrijednost iznosi 5.7. do 5.8. Za podešavanje pH vrijednosti koristile su se otopine lužine NaOH (Natrijev hidroksid) i kiseline HCl (Klorovodična kiselina), kap po kap dok se nije postigla željena vrijednost. Otopina se zatim stavila na zagrijavanje. Kada je temperatura otopine dostigla 82 °C, u otopinu se dodalo 30 g saharoze i 8 g agara (koji su prethodno bili pomiješani) uz brzo miješanje staklenim štapićem. Otopina se ostavila da kuha uz miješanje još nekoliko minuta do temperature od 95 °C. Nakon što je medij skuhan, raspoređen je u epruvete, koje zatim idu na sterilizaciju, kako bi se hranidbeni medij sterilizirao. Sterilizacija se provodila u autoklavu pri temperaturi od 212 °C i tlaku od 1 bara. Nakon sterilizacije i ukrućivanja, koje se prema Šikuten (2016.) odvija pri temperaturi od 40 °C, hranidbena podloga koristila za sadnju biljnog materijala u sterilnim uvjetima.

U ovom istraživanju korišten je MS hranidbeni medij. MS medij smatra se osnovnom hranidbenom podlogom za razmnožavanje biljaka u *in vitro* uvjetima (Jelaska 1994.). Prilikom postavljanja pokusa eksplantati su postavljeni na MS medij s dodatkom hormona rasta (B-inicijalni medij) koji je sadržavao dva različita hormona. Primijenjeni hormoni dolaze iz skupine regulatora rasta. Prilikom kuhanja medija dodano je 0.5 mg/L BAP (benziladenin-citokinin) i 0.05 mg/L IAA (indol-3-octena kiselina-auksin). Uz regulatore rasta dodan je i 1 mg/L PPM (*plant preservation mixture*) kao fungicid koji sprječava razvoj kontaminacija. Tijekom istraživanja pojavio se razvoj kalusnog tkiva na pojedinim eksplantatima. Zbog toga

je bilo potrebno mijenjati sastav hranidbenog medija. Iz tog razloga, prilikom presađivanja svi eksplantati bili su presađeni na MS hranidbenu podlogu (medij) bez dodataka hormona rasta nakon 5 tjedana. Kroz daljnje istraživanje nije više bilo potrebe za promjenu hranidbene podloge.

4.4. Uzorkovanje i sterilizacija biljnog materijala

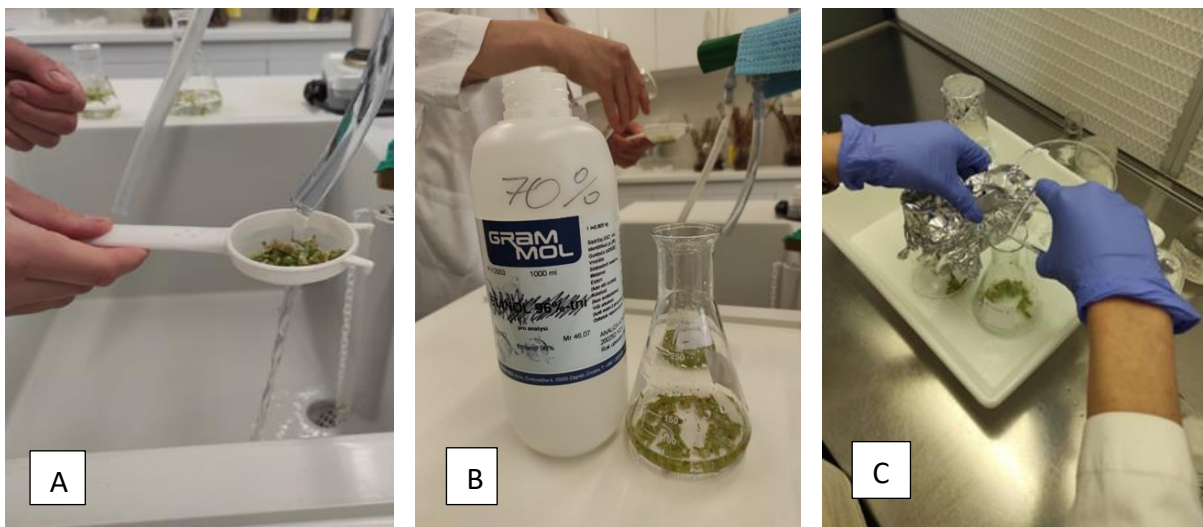
Uzgoj vinove loze u kulturi tkiva je uzgoj u strogo sterilnim uvjetima. Biljni materijal koji unosimo u kulturu tkiva *in vitro* potrebno je podvrgnuti procesu sterilizacije. Ukoliko se sterilizacija ne provede, u kratkom roku došlo bi do razvoja nepoželjnih mikroorganizama. Virusi, bakterije, kvasci i gljivice na hranidbenoj podlozi i u povoljnim uvjetima mogu uzorkovati kontaminaciju eksplantata koji su predmet istraživanja (Marković i Preiner 2011.). Ponekad se i nakon sterilizacije pojave kontaminacije nakon unosa eksplantata u kulturu tkiva. Takvi slučajevi su rijetki, ali treba ih uzeti u obzir i pravilnim postupkom sterilizacije pokušati otkloniti mogućnost bilo kakve kontaminacije biljnog materijala. U ovom istraživanju provedena je sterilizacija vrhova mladica prema protokolu autora Marković i Preiner (2011.). Mladice (izdanci) čiji su vegetacijski vrhovi uzorkovani, bile su u fazi rasta prije cvatnje, posjedovale su nekoliko manjih listova (Slika 4.4.1.).



Slika 4.4.1. Uzorkovanje izraslih mladica (A). Uklanjanje listova sa mladica i uzorkovanje vegetacijskog vrha (B). Vegetacijski vrh vinove loze sa dijelom stabljike i primordijalnim listovima (C).

Iz pupova odrvenjele rozgve izrasle su mladice, čiji su vegetacijski vrhovi uzorkovani s otprilike 10 mm pripadajuće stabljike i uronjeni u vodu na 15 minuta. Vrhovi mladica zatim su isprani pod mlazom tekuće vode, kako bi se uklonile površinske nečistoće (Slika 4.4.2.). Eksplantati su nakon toga uranjani 30 sekundi u 70 %-tni alkohol i isprani sterilnom vodom (Slika 4.4.2.). U slučaju da su uzorci bili duže ostavljeni u alkoholu, došlo bi do oštećenja tkiva

i potencijalno do slabije regeneracije vrhova meristema nakon unosa u kulturu tkiva. Uzorci su zatim uranjani u 5 %-tni natrij-hipoklorit, koji je u ovom slučaju sterilizacijsko sredstvo (Izosan G proizvođača Pliva (<https://www.pliva-sept.hr/proizvodi/dezinficijensi-povrsine/Izosan-G-1kg.html>)), uz dodatak nekoliko kapi Tween 20 (deterdžent koji poboljšava djelovanje sredstva za sterilizaciju). Otopina izosana G i Tweena 20 pripremila se ranije, tako da se u 100 ml vode otopilo 5 g izosana G i dodalo tri kapi Tweena 20. U toj otopini eksplantati su ostavljeni 15 minuta uz redovito miješanje. Uzorci su zatim isprani tri puta sa sterilnom vodom (Slika 4.4.2.). Postupak ispiranja provodio se u sterilnoj komori, svi ostali koraci sterilizacije provodili su se izvan sterilne komore. Nakon uspješnog ispiranja i sterilizacije uzorci su unošeni u kulturu tkiva i sađeni na hranidbeni medij izolacijom vršnog meristema.



Slika 4.4.2. Postupak sterilizacije biljnog materijala. Ispiranje vegetacijskih vrhova pod mlazom vode (A). Ispiranje vegetacijskih vrhova u 70 %-tnom alkoholu (B). Ispiranje vegetacijskih vrhova u sterilnoj vodi (C).

4.5. Unos eksplantata u kulturu tkiva

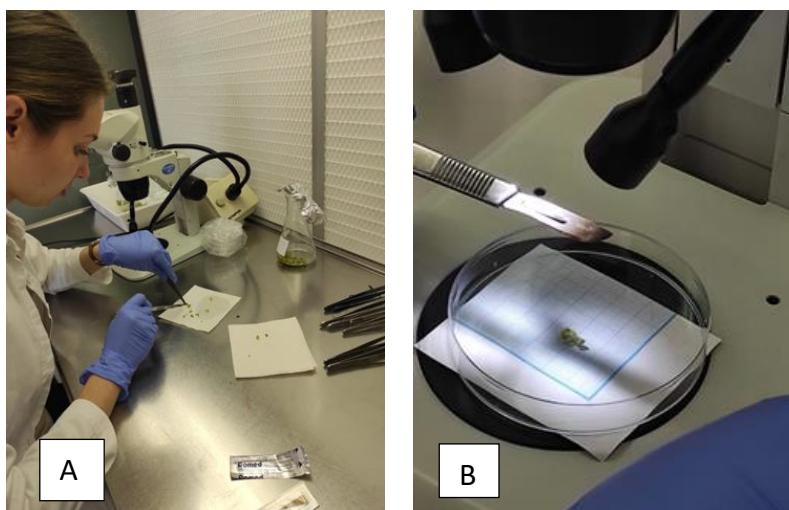
Brzina pupanja mladica bila je različita, stoga se unos eksplantata u kulturu tkiva vršio četiri puta. Prvi unos biljnog materijala proveden je četiri tjedna nakon unosa odrvenjelih reznica u zatvoreni prostor u vodu na pupanje. U postupak sterilizacije uneseni su eksplantati vegetacijskih vrhova mladica veličine 10 mm. Biljni materijal unošen je u *in vitro* kulturu nakon sterilizacije. Unos eksplantata u kulturu tkiva rađen je postupkom izolacije vršnog meristema prema utvrđenom protokolu autora Marković i sur. (2021.) (Slika 4.5.1.). Vršni meristemi izolirani su sa steriliziranih eksplantata vegetacijskih vrhova (veličine 10 mm). Na eksplantatima vegetacijskih vrhova odstranjivao se višak stabljike i primordijalni listovi kako bi se izolirao vrh meristema. Vršni meristemi veličine 1 mm sađeni su na inicijalni B-medij (MS medij s dodatkom hormona: 0,5 mg/L BAP i 0,05 mg/L IAA), kako bi potaknuli

inicijaciju rasta početne kulture i rast nadzemnih i podzemnih dijelova biljke. Veličina vršnog meristema mjerila se milimetarskim papirom, kako bi svi uneseni eksplantati bili približno iste veličine. Cijeli postupak izolacije izvodio se pod svjetlosnim mikroskopom zbog veličine uzoraka. Ukupno je u kulturu tkiva uneseno 14 genotipova vinove loze (Tablica 4.5.1.).

Tablica 4.5.1. Genotipovi vinove loze s brojem unesenih vršnih meristema i datumom unosa u kulturu tkiva.

Genotip	Sanitarni status	Reznice stavljene u vodu na pupanje	Datum unosa u kulturu tkiva	Broj unesenih vršnih meristema u kulturu tkiva
'Oskorušica' 1	GBV-1	11.02.22.	17.03.22	24
'Oskorušica' 2	GBV-1	14.02.22.	17.03.22	24
'Tanetova loza' 4	GBV-1	11.02.22.	17.03.22	24
'Tanetova loza' 2	GBV-1	14.02.22.	17.03.22	24
'Krstičevica' 2	GBV-1	14.02.22.	25.03.22	24
'Pavičić' 3	GBV-1	14.02.22.	17.03.22	24
'Ninska crvena' 6	GBV-1	14.02.22.	28.03.22	23
'Galac' 2	GVG	14.02.22.	28.03.22	24
'Silbijanac' 1	GVG	11.02.22.	28.03.22	24
'Silbijanac' 2	GVG	14.02.22.	04.04.22	24
'Petovka' 5	GVG	11.02.22.	04.04.22	23
'Petovka' 1	GVG	14.02.22.	28.03.22	24
'Gegić' 2	GBV-1 +GVG	11.02.22.	25.03.22	24
'Bljuzgavac' 2	GBV-1 +GVG	11.02.22.	25.03.22	10

U Tablici 4.5.1. može se uočiti da je kod nekih genotipova zbog nedostatka biljnog materijala unesen manji broj eksplantata, kao što je slučaj kod genotipova 'Petovka' 5, 'Bljuzgavac' 2 i 'Ninska crvena' 6, dok je kod većine ostalih genotipova uneseno 24 meristemska vrha.



Slika 4.5.1. Unos vegetacijskih vrhova izdanka u kulturu tkiva (A). Izolacija vrha meristema, uklanjanje dijela stabljike i primordijalnih listova (B).

4.6. Uvjeti uzgoja kulture tkiva

Kultura tkiva *in vitro* obuhvaća uzgoj biljaka u kontroliranim uvjetima. Kako bi se osigurali kontrolirani uvjeti, eksplantati su sterilizirani i uneseni u kulturu tkiva na hranidbenu podlogu u sterilnim uvjetima koje omogućava laminar. Laminar je uređaj kojim struji sterilni zrak i u njemu se odvijaju sve radnje u kulturi tkiva. Nakon unosa biljnog materijala, biljke se održavaju u komorama rasta u kontroliranim uvjetima temperature, vlage i uz reguliranu izmjenu dan – noć. Uvjeti u komori rasta bili su 26 °C, uz osvjetljenje od 16 sati (3000 lux) i 8 sati tame.

4.7. Presađivanje i praćenje rasta biljaka

Nakon unosa u kulturu tkiva, eksplantati su stavljeni u komoru rasta i redovito je praćen napredak rasta i razvoja biljaka. Na osnovu vanjskog izgleda eksplantata odlučivalo se o daljnjim koracima u kulturi tkiva. Nakon 2 tjedna od unosa materijala, vidljivo uginule biljke ili eventualno kontaminirane biljke su uklonjene. Zabilježen je broj izraslih eksplantata u drugom i četvrtom tjednu, dok se nakon pet tjedana rasta u kulturi tkiva mjerila visina biljaka, te su biljke ujedno presađene na novi medij. Prilikom presađivanja odbačene su uginule biljke i biljke čiji su listovi poprimili žutu ili smeđu boju. Unutar prva četiri tjedna došlo je do značajnog gubitka materijala, ali većina biljaka održana je u uvjetima kulture tkiva otprilike 3 mjeseca. Nakon prvog presađivanja u slučaju pojava nekroza ili smeđenja listova, biljke su podvrgnute krioprezervaciji (smrzavanju materijala u tekućem dušiku -196 °C) kako bi eksplantati ostali sačuvani za potrebe testiranja na viruse.

U petom tjednu izvršeno je presađivanje izraslih biljaka. Biljke su presađene na MS medij, bez dodataka regulatora rasta (BAP i IAA). Prilikom presađivanja rađeno je mjerenje visine svake biljke izrasle iz vršnog meristema. Biljke su s obzirom na svoju visinu podijeljene u tri skupine. One od 0 – 10 mm, od 10 – 30 mm i veće od 30 mm.

Parametri poput broja izraslih eksplantata u drugom tjednu, broj regeneriranih biljaka u četvrtom tjednu, odnos izraslih i regeneriranih eksplantata s obzirom na virus kojim su jedinke zaražene i visina biljaka obrađeni su programom XLSTAT (2007) Statistical Software for Excel za one sorte koje su imale dva ponavljanja (uzoraka tj. trsa). Korištena je metoda dvosmjerne analize ANOVA za utvrđivanje postojanosti razlika između sorata, te Duncan test radi njihove međusobne usporedbe tj. njihovih srednjih vrijednosti. U obradu su uvrštene one sorte za koje su iz vinograda uzeta dva genotipa iste sorte ('Oskorušica' 1, 'Oskorušica' 2, 'Tanetova loza' 4, 'Tanetova loza' 2, 'Silbijanac' 1, 'Silbijanac' 2, 'Petovka' 5 i 'Petovka' 1).

4.8. Aklimatizacija biljaka

Nakon 12 do 15 tjedana od unosa materijala u kulturu tkiva, redovitog praćenja rasta i presađivanja, biljke su dosegnule maksimalnu visinu, koja u ovom slučaju predstavlja visina epruvete (8 – 10 cm) i spremne su za postupak aklimatizacije (Slika 4.8.2.). Aklimatizacija (Slika 4.8.1.) je postupak jačanja biljaka i prijenos istih u uvjete *in vivo*. Tijekom postupka aklimatizacije biljkama je bilo potrebno osigurati visoku vlažnost zraka, dobro osvjetljenje, visoku količinu CO² i izbjeći zaraze gljivičnim ili bakterijskim organizmima, što znači da je biljke i dalje potrebno držati u relativno kontroliranim uvjetima.



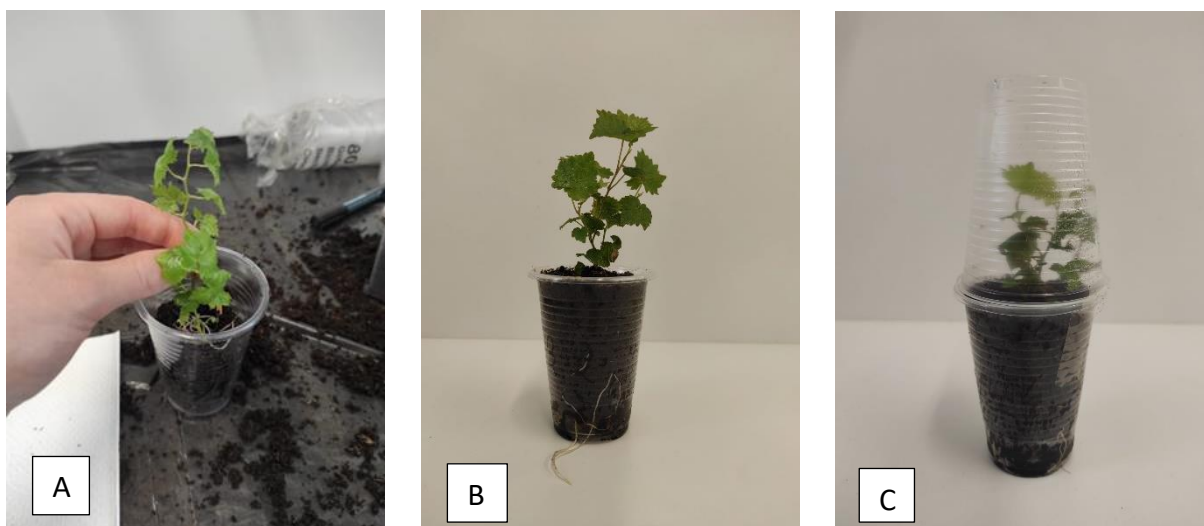
Slika 4.8.1. Biljke vinove loze u komori rasta na aklimatizaciji.

Aklimatizacija je provedena tako da su biljke presađene u supstrat, u plastične čaše i prekrivene još jednom plastičnom čašom sa gornje strane, kako bi svaka biljka imala svoj

prostor, sličan onome koji je imala u epruveti (Slika 4.8.3.). Čaša u kojoj je supstrat izbušena je na dnu, kako bi supstrat mogao upijati vodu iz kadice koja se nalazi ispod čaše. Postupkom aklimatizacije biljke su se postupno uvodile u *in vivo* uvjete. *In vitro* biljke nisu naviknute na samostalan život izvan epruvete gdje je vlažnost zraka velika, zbog toga imaju slabije razvijenu kutikulu i pojačano dehidriraju (Hazarika 2003.). Iz tog razloga svaka je biljka nakon sadnje dobila „poklopac“, gornju čašu. Kako su biljke rasle tako se gornji dio čaše polako otvarao, na kraju se gornja čaša u potpunosti uklanja. Na taj način biljke postupno postaju samostalne. U kadice koje su se nalazile ispod čaše redovito se nadolijevala voda, te su biljke odozgo prskane vodom, kako bi se održavala dovoljna količina vlage.



Slika 4.8.2. Jedinka odgovarajuće visine i dobro razvijenog korijenovog sustava spremna za postupak aklimatizacije.



Slika 4.8.3. Sadnja razvijene *in vitro* biljke u supstrat (A). Posađena biljka u supstratu spremna za postupak aklimatizacije (B). Biljka u postupku aklimatizacije prekrivena plastičnom čašom odozgo gdje čaša simulira kontrolirane uvjete slične epruveti (C).

U supstrat je posađeno 5 biljaka genotipa 'Tanetova loza' 4, 8 biljaka genotipa 'Galac' 2 i 9 biljaka genotipa 'Tanetova loza' 2. Aklimatizirane su samo one biljke koje su dosegnule odgovarajuću visinu, ostale su presađene na novi medij i testirane na viruse ovisno o tome koliko su dugo bile u porastu u epruveti tj. nakon 3, 5 i 9 mjeseci je napravljeno smrzavanje materijala krioprezervacijom (radi očuvanja uzoraka za testiranje na viruse).

4.9. Krajnje testiranje metodom lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (*real-time* PCR)

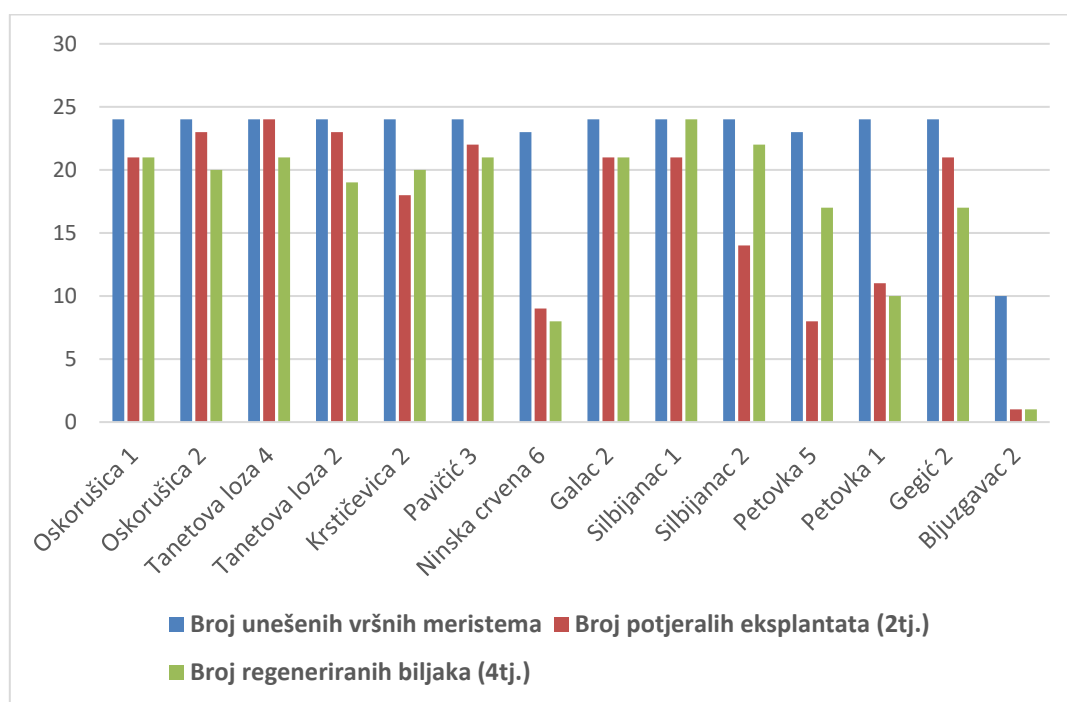
Biljke koje nisu uvedene u proces aklimatizacije zbog toga što nisu bile dovoljno razvijene, održavane su dalje u kulturi tkiva. Redovito je praćen rast i razvoj biljaka. One biljke koje su počele odumirati nakon presađivanja (nakon 3 mjeseca), podvrgnute su procesu smrzavanja u tekućem dušiku, te su kasnije testirane na prisutnost virusa. Ostale biljke koje su održavane u kulturi tkiva testirane su nakon 3, 5 i 9 mjeseci. Kako bi se testiranje na viruse nakon ozdravljanja u kulturi tkiva smatralo relevantnim, testirane su samo biljke stare tri mjeseca ili više. Nakon toga provedeno je testiranje lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (*real-time* PCR) na prisutnost virusa. Uzet je prosječan uzorak sa jedne biljke, od tri lista dužinom cijele stabljike (Jagunić i sur. 2022.). Testiranje je provedeno na 179 (55,9 %) jedinki od ukupno 320 unesenih vršnih meristema u *in vitro* kulturu zbog gubitka biljnog materijala koji su uzrokovali različiti čimbenici poput hranidbenog medija, utjecaja virusa i loše adaptabilnosti pojedinih genotipa na uvjete kulture tkiva. Tijekom cijelog istraživanja dolazilo je do postupnog gubitka biljnog materijala.

5. Rezultati i rasprava

U ovom poglavlju prikazat će se rezultati istraživanja. Prikazan je odnos unesenih meristema u odnosu na broj regeneriranih jedinki, utjecaj genotipa i hranidbene podloge. Prikazan je utjecaj zaraze G-virusom vinove loze (GVG) i badnavirusom vinove loze 1 (GBV-1) na regeneraciju, dinamiku rasta i razvoja biljaka u *in vitro* kulturi, uz mogućnost eliminacije dva nova virusa metodom kulture vršnih meristema i uspješnost eliminacije virusa vinove loze ovom metodom kulture tkiva.

5.1. Uspješnost početne kulture

Praćeni su parametri rasta i razvoja biljaka od početka unosa vršnih meristema u kulturu tkiva. Zabilježen je uspjeh početne kulture 2 tjedna nakon unosa eksplantata u kulturu tkiva (Tablica 5.1.1.). Uspjeh početne kulture odnosio se na broj izraslih eksplantata u odnosu na broj vršnih meristema unesenih u kulturu.



Graf 5.1.1. Prikaz broja preživjelih jedinki u drugom i četvrtom tjednu u odnosu na broj unesenih vršnih meristema.

Redovito su uklanjane kontaminirane ili uginule biljke. Praćenjem rasta eksplantata, već u prva dva tjedna može se primijetiti veliki gubitak biljnog materijala. Gubitak je uzrokovan različitim čimbenicima. Sorte su različito adaptabilne na uvjete kulture tkiva, kao takve su pokazivale i različite rezultate prilikom unosa u kulturu tkiva i daljnjeg održavanja u kulturi. Nakon dva tjedna od unosa eksplantata, bilo je moguće odrediti uspjeh početne kulture (%).

izraslih eksplantata u Tablici 5.1.1.), ali tek nakon 4 tjedna mogao se odrediti broj preživjelih jedinki (% regeneriranih biljaka u Tablici 5.1.1.). Sve sorte nisu rasle jednakom brzinom. Nakon 4 tjedna pojedine jedinke, čiji je rast započeo, ugibaju dok su pojedine tek počele rasti (Graf 5.1.1.). Tada je bilo moguće odrediti koliko je jedinki uspješno regenerirano.

Tablica 5.1.1. Prikaz postotka preživjelih jedinki nakon dva i četiri tjedna u odnosu na broj početnih vršnih meristema unesenih u kulturu tkiva.

Genotip	Sanitarni status	Broj unesenih vršnih meristema	% izraslih eksplantata (2 tjedna)	% regeneriranih biljaka (4 tjedna)
'Oskorušica' 1	GBV-1	24	87,5	87,5
'Oskorušica' 2	GBV-1	24	95,8	83,3
'Tanetova loza' 4	GBV-1	24	100	87,5
'Tanetova loza' 2	GBV-1	24	95,8	79,2
'Krstičevica' 2	GBV-1	24	75,0	83,3
'Pavičić' 3	GBV-1	24	91,6	87,5
'Ninska crvena' 6	GBV-1	23	39,1	34,78
'Galac' 2	GVG	24	87,5	87,5
'Silbijanac' 1	GVG	24	87,5	100
'Silbijanac' 2	GVG	24	58,3	91,6
'Petovka' 5	GVG	23	34,7	73,9
'Petovka' 1	GVG	24	45,8	41,6
'Gegić' 2	GBV-1 +GVG	24	87,5	70,8
'Bljuzgavac' 2	GBV-1 +GVG	10	10,0	10,0
Ukupan broj jedinki		320	74,1	75,6

*postotak se odnosi na broj unesenih vršnih meristema za pojedinačan genotip.

Razlike u regeneraciji između genotipova moguće je uočiti u Tablici 5.1.1. Najviše regeneriranih biljaka nakon četiri tjedna od unosa vršnih meristema, posjedovao je genotip 'Silbijanac' 1 sa 100 % regeneracije. Najnižu stopu regeneracije pokazuje genotip 'Bljuzgavac' 2 sa svega 10 % regeneriranih vršnih meristema. Slijede ga dva genotipa 'Ninska crvena' 6 i 'Petovka' 1, koji su pokazali vrlo malu stopu regeneracije već u prva 2 tjedna od unosa eksplantata. Taj trend nastavio se i nakon 4 tjedna od unosa. Kod pojedinih genotipova poput 'Oskorušica' 2, 'Tanetova loza' 4, 'Tanetova loza' 2, 'Gegić' 2, i 'Pavičić' 3 moguće je uočiti razliku u postotku regeneriranih biljaka nakon 2 tjedna i nakon 4 tjedna od unosa u

kulturu tkiva. Nakon 2 tjedna postotak biljaka kod nekih genotipova je veći, nakon čega se smanjuje, što dovodi do zaključka da su pojedine jedinice nakon unosa vršnih meristema započele rast koji nisu nastavile (Graf 5.1.1.). Navedene jedinice ne smatramo uspješno regeneriranima.

Tablica 5.1.2. Usporedba srednjih vrijednosti odabranih sorata s obzirom na % izraslih jedinki nakon dva tjedna i % regeneriranih biljaka nakon 4 tjedna.

Kategorija	% izraslih jedinki (2 tjedna)	% regeneriranih biljaka (4 tjedna)
'Oskorušica'	91,665 a	85,415 ab
'Silbijanac'	72,915 a	95,835 a
'Tanetova loza'	97,915 a	83,335 ab
'Petovka'	40,305 b	57,790 b
Pr > F(Model)	0,024	0,129
Signifikantan (značajan)	Da	Ne

*srednje vrijednosti kojima su pridružena ista slova nisu signifikantno različite prema Duncanovom testu za parametre sorata.

Na temelju statističkih podataka uzete su četiri sorte ('Oskorušica', 'Tanetova loza', 'Silbijanac' i 'Petovka') koje posjeduju po dva genotipa (dva ponavljanja), na kojima je provedena analiza za utvrđivanje postojanosti razlika između sorata, ANOVA (analiza varijance) i Duncan test za utvrđivanje razlika između sorata navedenih u Tablici 5.1.2. Sorte su signifikantno različite s obzirom na % izraslih jedinki nakon 2 tjedna što je vidljivo u Tablici 5.1.2. Parametri istih sorata regeneriranih nakon 4 tjedna ukazuju da nema značajnih razlika između sorata.

Utjecaj na % izraslih jedinki i % regeneracije biljaka ima genotip vinove loze ali i virusna zaraza, što je moguće vidjeti u Tablici 5.1.2. Varijabla 'Tanetova loza' i 'Oskorušica' zaražene GBV-1, signifikantno se razlikuju od varijable 'Silbijanac' i 'Petovka' zaražene GVG u % regeneriranih jedinki nakon četiri tjedna. Virusna zaraza ima utjecaj na regeneraciju vinove loze što potvrđuju autori Marković i sur. (2021.), koji su pratili preživljavanje i regeneraciju 18 autohtonih sorata vinove loze i zaključili kako su se sorte razlikovale u preživljavanju, ukorjenjivanju i regeneraciji s obzirom na virusnu zarazu.

5.2. Praćenje rasta biljaka u kulturi tkiva

Zbog praćenja brzine rasta genotipova, nakon unosa meristemskih vrhova u kulturu tkiva, eksplantatima je mjerena visina nakon 5 tjedana. Prilikom mjerenja eksplantati su podijeljeni u tri kategorije s obzirom na visinu: 0 – 10 mm, 10 – 30 mm i veće od 30 mm. Podaci dobiveni mjerenjem prikazani su u Tablici 5.2.1.

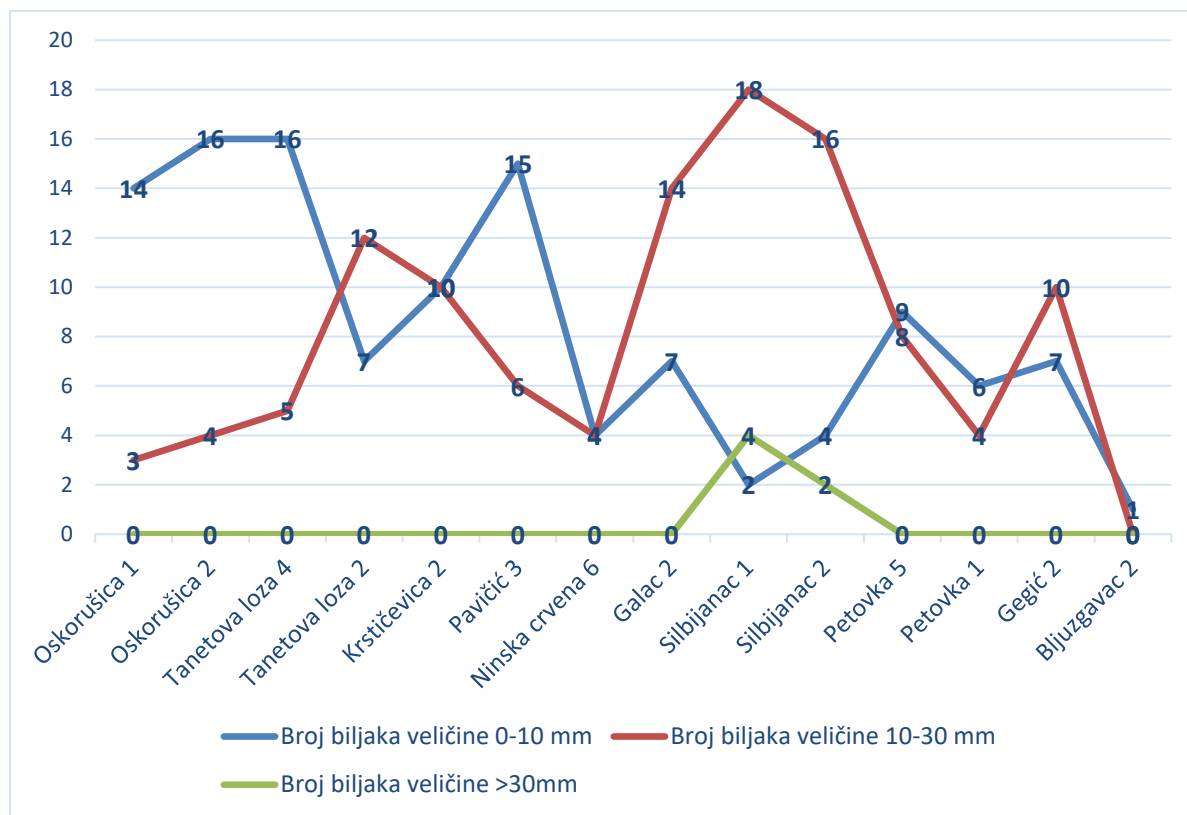
Tablica 5.2.1. Prikaz dinamike rasta biljaka 5 tjedana nakon unosa u kulturu tkiva.

Genotip	Sanitarni status	% biljaka veličine 0 –10 mm	% biljaka veličine 10 –30 mm	% biljaka veličine >30 mm
'Oskorušica' 1	GBV-1	82,4	17,6	0
'Oskorušica' 2	GBV-1	80,0	20,0	0
'Tanetova loza' 4	GBV-1	76,2	23,8	0
'Tanetova loza' 2	GBV-1	36,8	63,2	0
'Krstičevica' 2	GBV-1	50,0	50,0	0
'Pavičić' 3	GBV-1	71,4	28,6	0
'Ninska crvena' 6	GBV-1	50,0	50,0	0
'Galac' 2	GVG	33,3	66,7	0
'Silbijanac' 1	GVG	8,4	75,0	16,6
'Silbijanac' 2	GVG	18,2	72,7	9,1
'Petovka' 5	GVG	52,9	47,1	0
'Petovka' 1	GVG	60,0	40,0	0
'Gegić' 2	GBV-1 +GVG	41,2	58,8	0
'Bljuzgavac' 2	GBV-1 +GVG	100	0	0
Ukupno		49,6	47,9	2,5

*postotak se odnosi na ukupan broj regeneriranih biljaka nakon 4 tjedna (broj regeneriranih biljaka može vidjeti u Grafu 5.1.1.).

Primijećeno je stvaranje kalusnog tkiva na bazi biljke, koje može biti uvjetovano hormonima u samom mediju, zbog toga su biljke bile presađene na hranidbeni medij drugačijeg sastava. Pesađene su na MS medij bez dodatka regulatora rasta (BAP i IAA). Dinamika rasta biljaka prikazana je u Tablici 5.2.1. Najveći dio biljaka pripao je prvoj (0 – 10 mm) i drugoj (10 – 30 mm) skupini, dok treću skupinu (biljke veće od 30 mm), po veličini čini svega nekoliko jedinki sorte 'Silbijanac'. S obzirom na virusnu zarazu, može se primijetiti sljedeće: dva genotipa sorte 'Silbijanac' posjeduju jednostruku zarazu GVG i daju najveći postotak biljaka u drugoj i trećoj skupini po veličini. Mala je razlika u ukupnom broju biljaka koje pripadaju prvoj i drugoj skupini. U prvu skupinu biljaka ulazi 49,6 % jedinki, dok u drugu skupinu ulazi 47,9 % jedinki. Najviše jedinki u prvoj skupini pripada genotipovima 'Oskorušica' 1, 'Oskorušica' 2, 'Tanetova loza' 4, 'Krstičevica' 2 i 'Pavičić' 3. Svi navedeni genotipovi su zaraženi sa GBV-1. Uočljiv je utjecaj zaraze virusom na brzinu rasta biljaka u kulturi tkiva. Genotip utječe na uspješnost kulture meristema i na rast biljaka u kulturi tkiva, što možemo vidjeti iz Grafa 5.2.1. Sorta 'Silbijanac' sa svoja dva genotipa jedina posjeduje biljke visine preko 30 mm, dok svi ostali genotipovi pokazuju izrazito mali porast. Može se

uočiti udio biljaka u pojedinim skupinama po visini, obzirom na genotip kojem jedinke pripadaju (Graf 5.2.1.).



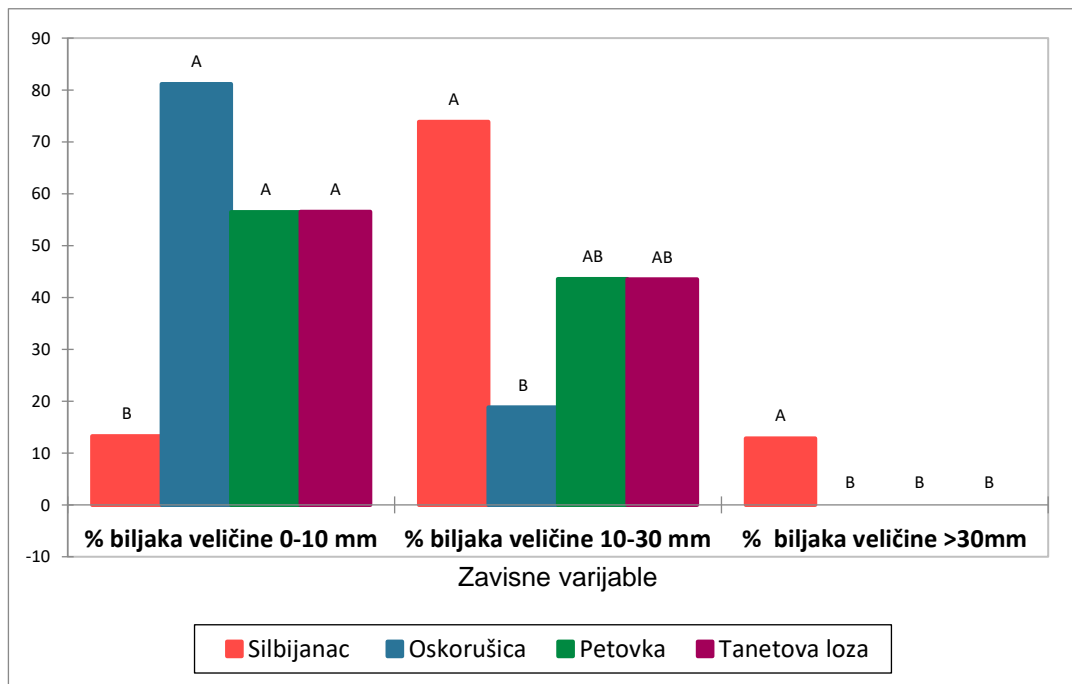
Graf 5.2.1. Visina eksplantata s obzirom na genotip nakon 5 tjedana od unosa vršnih meristema u kulturu tkiva.

Tablica 5.2.2. Usporedba srednjih vrijednosti visine odabranih sorata.

Kategorija	% biljaka veličine 0-10 mm	% biljaka veličine 10-30 mm	% biljaka veličine >30 mm
'Silbijanac'	13,255 b	73,865 a	12,845 a
'Oskorušica'	81,175 a	18,825 b	0,000 b
'Petovka'	56,470 a	43,530 ab	0,000 b
'Tanetova loza'	56,515 a	43,485 ab	0,000 b
Pr > F(Model)	0,040	0,076	0,019
Signifikantan (značajan)	Da	Ne	Da

*srednje vrijednosti kojima su pridružena ista slova nisu signifikantno različite prema Duncanovom testu za parametre sorata.

Usporedbenom srednjih vrijednosti u postizanju visine sorte pokazuju signifikantno značajne razlike u kategoriji visine 0-10 mm i >30 mm, dok u kategoriji 10-30 mm nije dokazana značajna razlika između ispitivanih sorata, što je vidljivo u Tablici 5.2.2.

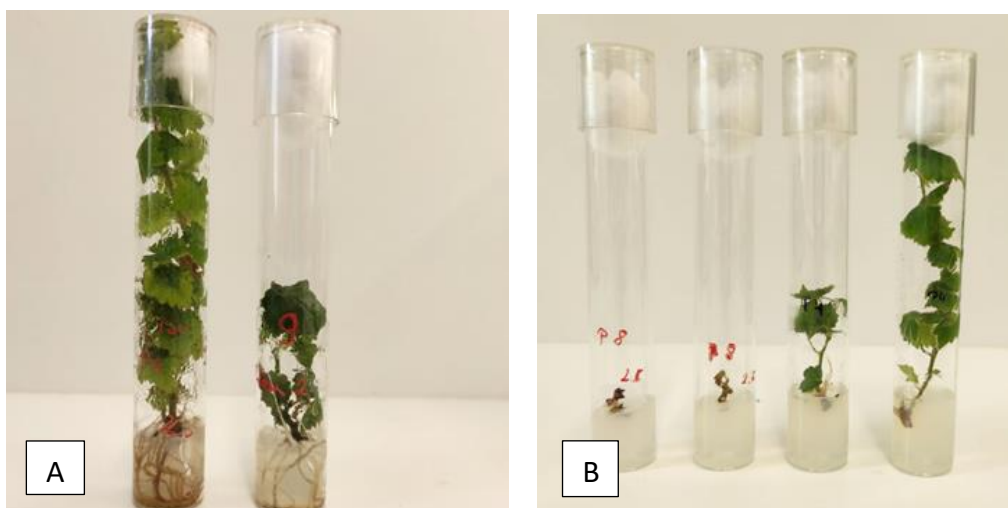


Graf 5.2.2. Usporedba prosječne vrijednosti visine četiri odabrane sorte.

Graf 5.2.2. pokazuje vrijednosti visine biljaka koje su dosegle nakon 5 tjedana u *in vitro* kulturi. Jasna odstupanja dokazana su u prvoj i trećoj kategoriji visine, gdje sorta 'Silbijanac' odstupa u obje kategorije, analizom ANOVA i Duncan testom utvrđena je signifikantnost. Naizgled postoje odstupanja u postignutom parametru visine druge kategorije, posebice kod pojedinih genotipova ('Oskorušica'), ali provedena analiza ANOVA, odnosno Duncan test nije utvrdio značajne razlike među njima (nema signifikantne razlike).

5.2.1. Utjecaj zaraze virusima na rast biljaka u *in vitro* kulturi

Preliminarnim istraživanjem postavljen je pokus radi kontrole rasta i razvoja jedinki koje posjeduju i jedinki koje ne posjeduju virus. Slika 5.2.1.1. pokazuje jedinke istog genotipa, gdje su slabije razvijene jedinke zaražene GBV-1, dobro razvijene jedinke nisu zaražene niti jednim od virusa, u potpunosti su zdrave. Može se uočiti negativan utjecaj zaraze virusom na brzinu rasta i razvoja biljaka u kulturi tkiva. U preliminarnom istraživanju korištena je sorta 'Portan' koja se smatra vrlo adaptabilnom sortom na uvjete kulture tkiva, prema autorima Marković i sur. (2013.) koristi se kao model biljka za ispitivanje uvjeta kulture tkiva.



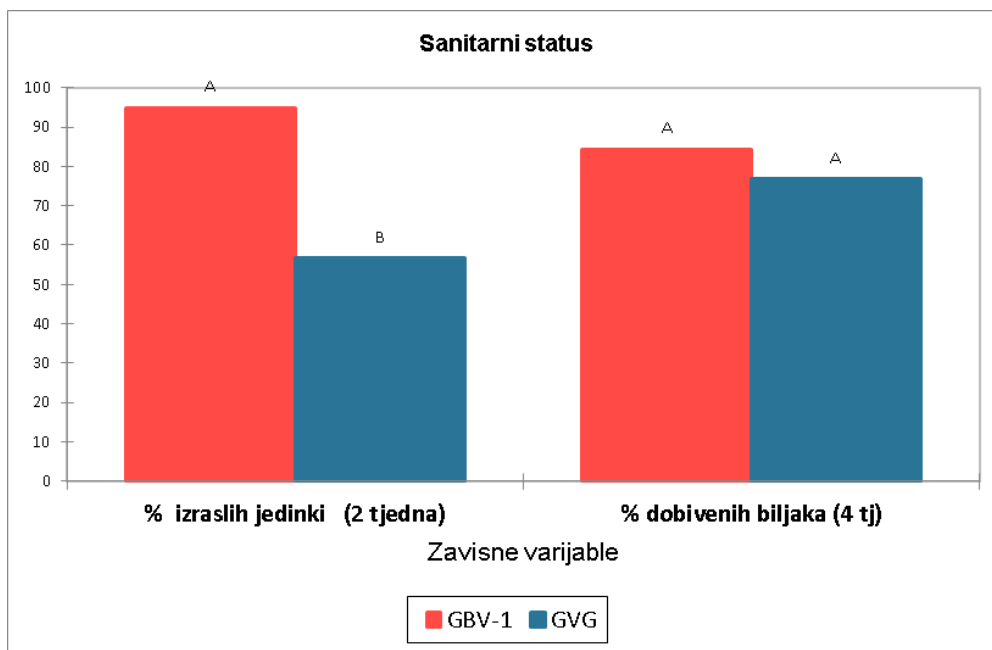
Slika 5.2.1.1. Prikaz jedinki sorte 'Portan', prva je zdrava od virusa, druga posjeduje zarazu GBV-1 (A). Prikaz jedinki sorte 'Portan', prva i druga jedinka s lijeva su zaražene GBV-1, dvije s desna su zdrave od virusa (B).

Tablica 5.2.1.1. Razlika između jedinki zaraženih GVG i GBV-1 s obzirom na % izraslih jedinki nakon 2 tjedna i % regeneriranih biljaka nakon 4 tjedna.

Kategorija	% izraslih jedinki (2 tjedna)	% dobivenih biljaka (4 tjedna)
GBV-1	94,790 a	84,375 a
GVG	56,610 b	76,813 a
Pr > F(Model)	0,017	0,584
Signifikantan (značajan)	Da	Ne

*srednje vrijednosti kojima su pridružena različita slova su signifikantno različite prema Duncanovom testu.

Prema pojedinačnoj zarazi GVG i GBV-1 uzeti su genotipovi: 'Oskorušica' 1, 'Oskorušica' 2, 'Tanetova loza' 4, 'Tanetova loza' 2, 'Silbijanac' 1, 'Silbijanac' 2, 'Petovka' 5 i 'Petovka' 1 na kojima je analizom za utvrđivanje postojanosti razlika između sorata (ANOVA) utvrđena signifikantnost u prvoj varijabli (% izraslih jedinki nakon 2 tjedna) između četiri sorte: 'Oskorušica', 'Tanetova loza', 'Silbijanac' i 'Petovka' (Tablica 5.2.1.1.). Analizom ANOVA potvrđeno je da postoje značajne razlike između navedenih sorata s obzirom na virusnu zarazu koju posjeduju i utjecaj virusa na postotak izraslih jedinki u drugom tjednu. Sanitarni status signifikantno je utjecao na % izraslih eksplantata nakon 2 tjedna ali ne i na % regeneriranih biljaka nakon 4 tjedna (Graf 5.2.1.1.).



Graf 5.2.1.1. Usporedba utjecaja sanitarnog statusa s obzirom na postotak izraslih biljaka (2 tjedna) i postotak regeneriranih biljaka (4 tjedna).

Tablica 5.2.1.2. Utjecaj virusne zaraze na visinu biljaka.

Kategorija	% biljaka veličine 0-10 mm	% biljaka veličine 10-30 mm	% biljaka veličine >30 mm
GVG	34,863 a	58,698 a	6,423 a
GBV-1	68,845 a	31,155 a	0,000 a
Pr > F(Model)	0,087	0,096	0,161
Signifikantan (značajan)	Ne	Ne	Ne

*srednje vrijednosti kojima su pridružena ista slova nisu signifikantno različite prema Duncanovom testu.

Ne postoji signifikantna razlika između visine sorata zaraženih sa ova dva virusa u niti jednoj od tri kategorije visine (0-10 mm, 10-30 mm i >30 mm) (Tablica 5.2.1.2.).

5.2.2. Utjecaj genotipa na rast biljaka u kulturi tkiva

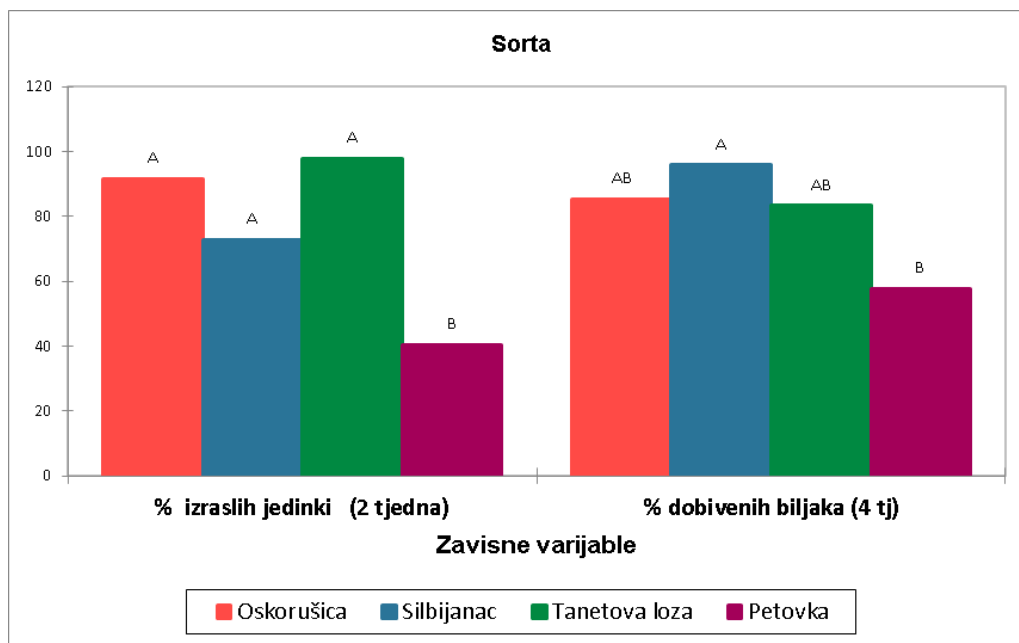
Tablica 5.2.1. ukazuje na utjecaj pojedinog genotipa na rast jedinki u kulturi tkiva. Marković i sur. (2014.) utvrdili su utjecaj genotipa na adaptabilnost jedinki u *in vitro* uzgoju vinove loze. Istraživanjem provedenim na osam genotipa uvidjeli su da pojedine sorte imaju slabiji rast u kulturi tkiva, dok neke sorte pokazuju izuzetan rast. Istu činjenicu potvrđuje i Slika 5.2.2.1., koja pokazuje genotipove zaražene istim virusom, GBV-1. Sve jedinke unesene su metodom vršnog meristema u kulturu tkiva istog datuma, stoga se ne može reći da je

starost biljaka imala utjecaj na njihov porast. Može se uočiti da genotipovi 'Oskorušica' 1, 'Oskorušica' 2 i 'Pavičić' 3 pokazuju nepovoljan rast u odnosu na dva genotipa iste sorte 'Tanetove loze' 4 i 'Tanetove loze' 2. Jedinke prva tri genotipa sa slike imaju jedan razvijen list i stale su sa rastom, dok jedinke 'Tanetove loze' 4 i 'Tanetove loze' 2 imaju razvijen nadzemni dio sa nekoliko razvijenih listova i podzemni dio korijena koji se počeo razvijati. Sve biljke rasle su na istoj hranidbenoj podlozi, čime možemo zaključiti da na rast i razvoj biljaka u kulturi tkiva ima utjecaj genotip vinove loze, što su potvrdili autori Martinelli i sur. (1996.); Henry i sur. (1994.).



Slika 5.2.2.1. Utjecaj genotipova na rast i razvoj u kulturi tkiva jedinki zaraženih GBV-1.

Usporedbom srednjih vrijednosti visine odabranih sorata ('Oskorušica', 'Tanetova loza', 'Silbijanac' i 'Petovka') utvrđeno je da postoji signifikantna razlika između sorata u dvije kategorije po visini, što ukazuje na utjecaj genotipa (u ovom slučaju sorte) na rast i razvoj u kulturi tkiva (Tablica 5.2.2.).



Graf 5.2.2.1. Utjecaj sorte s obzirom na % izraslih jedinki nakon 2 tjedna i % regeneriranih biljaka nakon 4 tjedna u kulturi tkiva.

Analizom ANOVA i Duncan testom odabrane sorte su signifikantno različite s obzirom na % izraslih jedinki nakon 2 tjedna što je vidljivo u Tablici 5.1.2. dok ne pokazuju signifikantnost s obzirom na % regeneriranih jedinki 4 tjedna nakon unosa u kulturu tkiva (Graf 5.2.2.1.).

5.3. Uspješnost aklimatizacije

Nakon uspješnog rasta biljaka u kulturi tkiva, biljke su dosegnule visinu odraslih *in vitro* biljaka i pristupilo se postupku aklimatizacije. Aklimatizacija je postupak postepenog prilagođavanja *in vitro* biljaka na vanjske uvjete (*in vivo*). Provedena je na relativno malom broju biljaka (Tablica 5.3.1.). Aklimatizirane su biljke tri genotipa čije su jedinice postigle odgovarajuću visinu, visinu epruvete (Slika 5.3.1.). 'Silbijanac' kao sorta koja je imala najveći broj biljaka visine preko 30 mm, nema niti jednu jedinku koja je nastavila aktivan rast i dosegla visinu epruvete. Za razliku od genotipova 'Tanetova loza' 2, 'Tanetova loza' 4 i 'Galac' 2, koji se nisu značajno istaknuli prilikom mjerenja visine biljaka (koje se odvalo nakon 5 tjedana od unosa biljaka u kulturu tkiva). Nakon mijenjanja hranidbene podloge isti genotipovi pokazuju značajniji porast. U ovom slučaju zamjećujemo utjecaj hranidbene podloge na rast i razvoj biljaka, te bi se moglo zaključiti da je nekim genotipovima više odgovarao prvi sastav hranidbene podloge u kojoj su se nalazili regulatori rasta (BAP i IAA). Također značajan je utjecaj i virusa, jer se smatra da sve jedinice nisu oslobođene od virusa metodom vršnog meristema.



Slika 5.3.1. Usporedba rasta biljaka različitih genotipova u kulturi tkiva, aklimatizacija se vršila na biljkama odgovarajuće visine sa razvijenim korijenovim sustavom.

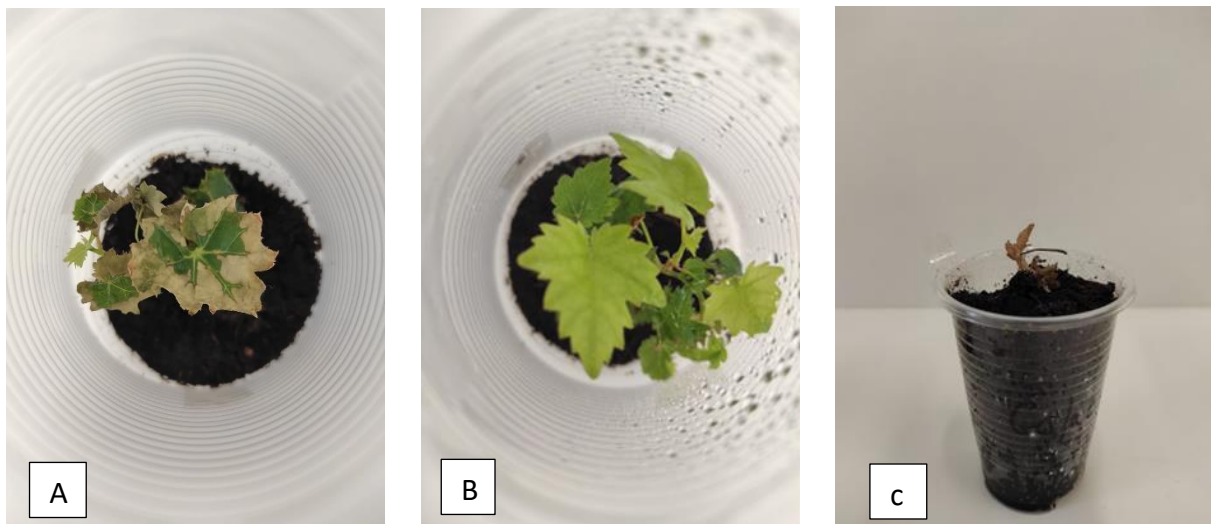
Tablica 5.3.1. Usporedba broja vršnih meristema unesenih u kulturu, broja regeneriranih biljaka, broja biljaka stavljenih u postupak aklimatizacije i broja aklimatiziranih biljaka.

Genotip	Sanitarni status	Uneseni vršni meristemi	Broj regeneriranih biljaka (4 tjedna)	U postupku aklimatizacije (broj biljaka)	Aklimatizirano biljaka
'Oskorušica' 1	GBV-1	24	21	-	-
'Oskorušica' 2	GBV-1	24	20	-	-
'Tanetova loza' 4	GBV-1	24	21	5	2
'Tanetova loza' 2	GBV-1	24	19	9	4
'Krstičevica' 2	GBV-1	24	20	-	-
'Pavičić' 3	GBV-1	24	21	-	-
'Ninska crvena' 6	GBV-1	23	8	-	-
'Galac' 2	GVG	24	21	8	4
'Silbijanac' 1	GVG	24	24	-	-
'Silbijanac' 2	GVG	24	22	-	-
'Petovka' 5	GVG	23	17	-	-
'Petovka' 1	GVG	24	10	-	-
'Gegić' 2	GBV-1 +GVG	24	17	-	-
'Bljuzgavac' 2	GBV-1 +GVG	10	1	-	-
Ukupno (broj biljaka)		320	242	22	10
Ukupno (%)		100	75,6	6,9	3,1

*postotak se odnosi na ukupan broj unesenih eksplantata.

Iz Tablice 5.3.1. može se zaključiti da je regeneracija biljaka iz vrha meristema dala dobre rezultate, ali mali broj biljaka održan je u kulturi tkiva i pristupio postupku aklimatizacije. Mali broj biljaka je razvio dovoljno veliki korijen i nadzemnu masu kako bi mogao biti podvrgnut aklimatizaciji, svega 6,9 %, od čega je samo 3,1 % biljaka uspješno aklimatizirano, što ukupno čini 10 biljaka. Pospóšilová (1999.) ukazuje na to da je postupak aklimatizacije ograničen visokim postotkom izgubljenih biljaka, od ukupnog broja unesenih biljaka u postupak aklimatizacije ovim istraživanjem izgubljeno je 55,5 % biljaka. Uspješno su aklimatizirane četiri jединke genotipa 'Tanetova loza' 2, dvije jединke genotipa 'Tanetova loza' 4 i četiri jединke genotipa 'Galac' 2.

Pojedine jединke koje su bile uvedene u aklimatizaciju, stale su sa rastom odmah nakon presađivanja i odumrle, dok su pojedine biljke nastavile rasti određeno vrijeme, do trenutka kada bi počele mijenjati boju listova i odumirati. Slika 5.3.2. prikazuje različite reakcije jединki na postupak aklimatizacije.



Slika 5.3.2. Različite reakcije jединki vinove loze na postupak aklimatizacije. Jedinka vinove loze koja je negativno reagirala na proces aklimatizacije, dolazi do sušenja listova (A). Jedinka koja je uspješno prošla proces aklimatizacije (B). Jedinka koja je odbacila listove i osušila se nakon ulaska u postupak aklimatizacije (C).

5.4. Uspješnost kulture tkiva i metode vršnog meristema u ozdravljivanju vinove loze od virusa

Dinamika održavanja biljaka u kulturi tkiva i uspješnost eliminacije virusa metodom vršnog meristema *in vitro* prikazana je u Tablici 5.4.2. Svi genotipovi nisu posjedovali istu dinamiku rasta nakon unosa vršnih meristema u *in vitro*. Zbog različite dinamike rasta genotipova i njihovog potencijala odumiranja, biljke su testirane nakon 3, 5 i 9 mjeseci, obzirom na to koliko dugo su preživjele u uvjetima kulture tkiva (Tablica 5.4.1.).

Tablica 5.4.1. Uspješnost eliminacije virusa kulturom vršnog meristema *in vitro* na biljkama održavanih u kulturi tkiva 3, 5 i 9 mjeseci.

Genotip	Broj testiranih biljaka (3mj.)	Ozdravljene biljke (3mj.)	Broj testiranih biljaka (5mj.)	Ozdravljene biljke (5mj.)	Broj testiranih biljaka (9mj.)	Ozdravljene biljke (9mj.)
'Oskorušica' 1	14	-	-	-	-	-
'Oskorušica' 2	17	-	-	-	-	-
'Tanetova loza' 4	14	-	2	-	-	-
'Tanetova loza' 2	6	-	1	-	4	-
'Krstičevica' 2	12	-	3	-	-	-
'Pavičić' 3	18	-	-	-	-	-
'Ninska crvena' 6	8	-	-	-	-	-
'Galac' 2	13	-	-	-	4	-
'Silbijanac' 1	3	-	10	-	-	-
'Silbijanac' 2	2	-	6	-	2	-
'Petovka' 5	16	2	-	-	-	-
'Petovka' 1	10	-	-	-	-	-
'Gegić' 2	16	1	-	-	-	-
'Bljuzgavac' 2	1	-	-	-	-	-
Ukupan broj biljaka	150	3	19	0	10	0

Iz Tablice 5.4.1 može se vidjeti da je najveći broj biljaka testiran nakon održavanja 3 mjeseca u kulturi tkiva. Od ukupnog testiranja u kojemu je sudjelovalo 179 biljaka, tri jedinice su definirane kao zdrave od virusa. Tri zdrave jedinice detektirane su u prvom testiranju nakon tri mjeseca od ukupno testiranih 150 biljaka. Druga dva testiranja nakon 5 (testirano je 19 biljaka) i 9 mjeseci (testirano je 10 biljaka) nisu dala pozitivne rezultate, niti jedna jedinka nije bila ozdravljena od virusa. U odnosu na ukupan broj eksplantata unesenih u kulturu tkiva metodom vršnog meristema *in vitro* ozdravljeno je 0,9 % biljaka (Tablica 5.4.2.). Mali broj ozdravljenih jedinki mogao bi se pripisati veličini eksplantata, autori Panattoni i sur. (2013.) tvrde da je optimalna veličina izoliranog tkiva meristema 0,2 – 0,7 mm, ukoliko se želi postići eradikacija virusa, dok je u ovom istraživanju uzorkovan eksplantat veličine 1 mm. Autori Vivek i Modgil (2018.) navode veličinu meristema kao ključnu za eradikaciju virusa prilikom korištenja metode vršnog meristema. Fayek i sur. (2009.) zaključili su da biljke

dobivene iz meristema veličine 1 mm imaju veću stopu zaraženosti virusima od onih dobivenih iz meristema veličine 0.5 mm.

Tablica 5.4.2. Dinamika održavanja biljaka u kulturi tkiva i uspješnost eliminacije virusa kulturom vršnog meristema *in vitro*.

Genotip	Broj unesenih vršnih meristema	Regenerirane biljke nakon 4 tjedna	Testirane <i>in vitro</i> i aklimatizirane biljke	Ozdravljene biljke (<i>Virus free</i>)
'Oskorušica' 1	24	21	14	-
'Oskorušica' 2	24	20	17	-
'Tanetova loza' 4	24	21	16	-
'Tanetova loza' 2	24	19	11	-
'Krstičevica' 2	24	20	15	-
'Pavičić' 3	24	21	18	-
'Ninska crvena' 6	23	8	8	-
'Galac' 2	24	21	17	-
'Silbijanac' 1	24	24	13	-
'Silbijanac' 2	24	22	10	-
'Petovka' 5	23	17	16	2
'Petovka' 1	24	10	10	-
'Gegić' 2	24	17	16	1
'Bljuzgavac' 2	10	1	1	-
Ukupno broj biljaka	320	242	179	3
Ukupno (%)	100	75,6	55,9	0,9

*postotak se odnosi na ukupan broj unesenih vršnih meristema.

6. Zaključak

Provedenim istraživanjem doneseni su sljedeći zaključci:

Uspješnost početne kulture tkiva ukazuje na 74,1 % izraslih eksplantata u odnosu na broj unesenih vršnih meristema u kulturi tkiva. Metodom vršnog meristema od unesenih 320 eksplantata vršnog meristema 24,4 % odumrlo je već u prva četiri tjedna od unosa u kulturu tkiva, regeneriranim se smatra 75,6 % eksplantata. Broj biljaka nastavio se smanjivati tijekom istraživanja radi utjecaja hranidbene podloge, genotipa i sanitarnog statusa. Tehnika vršnog meristema bila je vrlo uspješno provedena na autohtonih hrvatskim sortama i dala je zadovoljavajuće rezultate.

Sanitarni status utjecao je na rast, razvoj i regeneraciju biljaka dobivenih kulturom vršnih meristema. Jedinke zaražene GBV-1 ostvarile su 77,8 % regeneracije, one zaražene GVG 78,9 %. Postotak regeneracije genotipova zaraženih mješovitom zarazom iznosi 52,9 %. Genotipovi koji posjeduju pojedinačnu zarazu jednim od virusa (GVG ili GBV-1) pokazali su veći postotak regeneracije od genotipova koji posjeduju mješovitu zarazu (GBV-1 + GVG), međutim to nije bilo pravilo kod svakog genotipa. Genotipovi 'Petovka' 1 i 'Ninska crvena' 6 pokazali su nisku stopu regeneracije iako su zaraženi samo jednim od virusa. Sanitarni status utjecao je i na visinu eksplantata, preliminarnim testiranjem utvrđeno je da jedinke zaražene GBV-1 virusom rastu sporije od jedinki slobodnih od testiranog virusa.

Utjecaj genotipa na regeneraciju jedinki bio je izražen već u prva dva tjedna nakon unosa eksplantata u *in vitro* kulturu. Genotipovi 'Petovka' 5, 'Petovka' 1 i 'Ninska crvena' 6 već u prva dva tjedna pokazali su mali postotak izraslih eksplantata, taj trend nastavio se i nakon četiri tjedna od unosa. Uočen je utjecaj genotipa na visinu biljaka dobivenih tehnikom vršnog meristema. Kod mjerenja visine istaknula se sorta 'Silbijanac' uz genotipove 'Silbijanac' 1 i 'Silbijanac' 2 koji su jedini posjedovali jedinke čija je visina bila veća od 30 mm, pozitivan trend nije se nastavio, genotipovi nisu dostigli odgovarajuću visinu kako bi pristupili postupku aklimatizacije. Od ukupnog broja unesenih biljaka u kulturu tkiva 6,9 % biljaka pristupilo je procesu aklimatizacije dok je samo 3,1 % biljaka uspješno aklimatiziran.

Provedenim testiranjem lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (*real-time* PCR), uspješno je eliminiran GVG iz dvije jedinke genotipa 'Petovka' 5 i eliminirani su GVG i GBV-1 (mješovita zaraza) iz jedne jedinke genotipa 'Gegić' 2. Ostale jedinke dale su pozitivan rezultat prilikom testiranja na viruse. U cijelom istraživanju od ukupnog broja jedinki, ozdravljeno je 0,9 % biljaka, što upućuje da je metoda vršnog meristema primjenjiva metoda za eliminaciji GVG i GBV-1 ali u vrlo malom postotku, što ukazuje na potrebu za daljim istraživanjima ovdje navedene metode eliminacije virusa.

7. Popis literature

1. Andabaka Ž. (2015). Ampelografska evaluacija autohtonih dalmatinskih sorata vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Doktorski rad. Agronomski fakultet, Zagreb.
2. Andabaka Ž., Stupić D., Marković Z., Preiner D. (2011). Novi trendovi u proizvodnji sadnog materijala autohtonih sorata vinove loze u Hrvatskoj. *Glasnik zaštite bilja* 34(1):46 – 56.
3. Bettoni J. C., Costa M. D., Gardin J. P. P., Kretschmar A. A., Pathirana R. (2016). Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38.
4. Bhat A. I., Hohn T., Selvarajan R. (2016). Badnaviruses: the current global scenario. *Viruses*, 8(6), 177.
5. Blouin A. G., Keenan S., Napier K. R., Barrero R. A., MacDiarmid R. M. (2018). Identification of a novel vitivirus from grapevines in New Zealand. *Archives of virology*, 163, 281-284.
6. Bota J., Cretazzo E., Montero R., Rosselló J., Cifre J. (2014). Grapevine fleck virus (GFkV) elimination in a selected clone of *Vitis vinifera* L. cv. Manto negro and its effects on photosynthesis. *OENO One*, 48(1), 11-19.
7. Bulić S. (1949). Dalmatinska ampelografija. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb.
8. Chirkov S., Sheveleva A., Tsygankova S., Sharko F., Mitrofanova I. (2022). Characterization of divergent grapevine badnavirus 1 isolates found on different fig species (*Ficus* spp.). *Plants*, 11(19), 2532.
9. Classic Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15, 473-497.
10. Čarija M., Radić T., Černi S., Mucalo A., Zdunić G., Vončina D., Hančević K. (2022). Prevalence of virus infections and GLRaV-3 genetic diversity in selected clones of Croatian indigenous grapevine cultivar Plavac Mali. *Pathogens*, 11(2), 176.
11. Debat H., Zavallo D., Soltero Brisbane R., Vončina D., Almeida R. P. P., Blouin A. G., Al Rwahnih M., Gomez-Talquenca S., Asurmendi S. (2019). Grapevine virus L: a novel vitivirus in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 155, 319-328.
12. Diaz-Lara A., Brisbane R. S., Aram K., Golino D., Al Rwahnih M. (2019). Detection of new vitiviruses infecting grapevine in California. *Archives of Virology*. 164: 2573–2580.
13. Fuchs M. (2020). Grapevine viruses: A multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *Journal of Plant Pathology*, 102(3), 643-653.
14. Gelderblom H. R. (1996). Structure and classification of viruses. *Medical Microbiology. 4th edition, University of Texas Medical Branch at Galveston*.
15. Hančević K., Zdunić 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*, 199-202.
16. Hazarika B. N. (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, Vol. 85, 12: 1704-1710.

17. Henry Y., Vain P., De Buyser J. (1994). Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica*, 79, 45-58.
18. Hollings M. (1965). Disease control through virus-free stock. *Annual Review of Phytopathology*, 3(1), 367-396.
19. Ivić D., i Fazinić T. (2011). Gospodarski značajni virusi vinove loze. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo. Zagreb.
20. Jagunić M. (2023). Ecology and characterization of grapevine virus g and grapevine badnavirus 1. Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Agriculture.
21. Jagunić M., De Stradis A., Preiner D., La Notte P., Al Rwahnih M., Almeida R. P., i Vončina D. (2022). Biology and Ultrastructural Characterization of Grapevine Badnavirus 1 and Grapevine Virus G. *Viruses*, 14(12), 2695.
22. Jagunić M., Diaz-Lara A., Rwahnih M. A., Preiner D., Stevens K., Zdunić G., Vončina D. (2022). Grapevine badnavirus 1: Detection, genetic diversity, and distribution in Croatia. *Plants*, 11(16), 2135.
23. Jelaska S. (1994). Kultura biljnih stanica i tkiva. Školska knjiga, Zagreb.
24. Karoglan Kontić J., Preiner D., Šimon S., Zdunić G., Poljuha D., Maletić E. (2009). Sanitary Status of Croatian Native Grapevine Varieties. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 74 (2): 99 – 103.
25. Lewandowski V. T. (1991). Rooting and Acclimatization of Micropropagated *Vitis labrusca* Delaware'. *HortScience*, 26(5), 586-589.
26. Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2008). Vinova loza – Ampelografija, ekologija, oplemenjivanje. Školska knjiga, Zagreb.
27. Maletić 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. (2015). Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
28. Maletić E., Preiner D., Pejić I., Karoglan Kontić J., Šimon S., Husnjak S., Marković Z., Andabaka Ž., Stupić D., Žulj Mihaljević M., Merkaš S. (2015). Sorte vinove loze Hrvatskog zagorja. Krapinko-zagorska županija, Krapina.
29. Maree H. J., Blouin A. G., Diaz-Lara A., Mostert I., Al Rwahnih M., Candresse T. (2020). Status of the current vitivirus taxonomy. *Archives of Virology*, 165, 451-458.
30. Marković Z., Chatelet P., Sylvestre I., Kontić J. K., Engelmann F. (2013). Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in vitro shoot tips. *Central European Journal of Biology*, 8, 993-1000.
31. Marković Z., Preiner D. (2011). Biotehnologija u vinogradarstvu. Pregledni rad. Glasnik zaštite bilja, 34(1), 58-67.
32. 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*, 1087 – 1098.

33. Marković Z., Preiner D., Stupić D., Andabaka Ž., Šimon S., Vončina D., Engelmann F. (2015). Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 54, 247-251.
34. Marković Z., Preiner D., Stupić D., Andabaka Ž., Šimon S., Vončina D., Engelmann F. (2015). Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 54, 247-251.
35. Marković Z., Zrilić A., Šikuten I., Štambuk P., Tomaz I., Vončina D., 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.
36. Martelli G. P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96(1sup), 1-136.
37. Martelli G.P. (2018). Where grapevine virology is heading to. Proceedings of the 19th Meeting of the ICVG, 9.–12.04.2018., Santiago, Chile.
38. Martinelli L., Poletti V., Bragagna P., Poznanski E. (1996). A study on organogenic potential in the *Vitis* genus. *Vitis*, 35(4), 159-161.
39. Matic S., Minafra A., Bosica D., Cunha A.T.P., Martelli G.P. (2009). Production of antibodies to Little cherry virus 1 coat protein by DNA prime and protein boost immunization. *Journal of Virological Methods*, 155, 72–76.
40. Mekuria G., Ramesh S. A., Alberts E., Bertozzi T., Wirthensohn M., Collins G., Sedgley M. (2003). Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of PNRSV and PDV in Australian almond trees. *Options Mediterraneennes*, 193-6.
41. Mirošević N., Kontić Karoglan J. (2008). *Vinogradarstvo*, Nakladni zavod Globus, Zagreb.
42. Mullins M. G., Bouquet A., Williams L. E. (1992). *Biology of the grapevine*. Cambridge University Press.
43. Narodne novine 133/2006. Pravilnik o stavljanju na tržištu materijala za vegetativno umnažanje loze. Narodne novine d.d. Zagreb.
44. Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. (2013). Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (1), 173-188.
45. Pavletić B. (2019). Detekcija virusa u hrvatskim autohtonim kultivarima vinove loze metodom RT-PCR prije i nakon ozdravljanja. *Rektorski rad. Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb*.
46. Pejić I., Maletic E., Karoglan Kontić J., Kozina, B., Mirošević N. (1998, July). Diversity of autochthonous grapevine genotypes in Croatia. In *VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding 528* (pp. 67-74).
47. Poljuha D., Sladonja B., Bubola M. (2010). Incidence of viruses infecting grapevine varieties in Istria (Croatia). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, Vol.8 (1) : 166 – 169.
48. Pospóšilová J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D., Plzáková Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia plantarum*, 42, 481-497.

49. 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. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
50. Rowhani A., Osman F., Daubert S. D., Al Rwahnih M., Saldarelli P. (2017). Polymerase chain reaction methods for the detection of grapevine viruses and viroids. *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, 431-450.
51. Schaad N. W., Opgenorth D., Gauth P. (2002). Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology*, 92(7), 721-728.
52. Skiada F. G., Maliogka V. I., Katis N. I., Eleftheriou E. P. (2013). Elimination of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars by in vitro chemotherapy. *European journal of plant pathology*, 135, 407-414.
53. Smerea S., Andronic L., Grigorov T., Bujoreanu V. (2010). In vitro regenerative genotypic specificity of meristems from virus infected grapevine cultivars. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(S2), 19-25.
54. Šikuten I. (2016). *In vitro razmnožavanje virusima zaraženih genotipova vinove loze u postupku ozdravljivanja krioterapijom*, University of Zagreb. Faculty of Agriculture. Department of Viticulture and Enology.
55. Vivek M., Modgil M. (2018). Elimination of viruses through chemotherapy and meristem culture in apple cultivar 'Oregon Spur-II'. *Virus Disease*, 29, 75-82.
56. Vončina D. (2021). Rasprostranjenost ekonomski važnih virusa vinove loze u Republici Hrvatskoj i njihov utjecaj na vinogradarsku proizvodnju. *Glasilo biljne zaštite*, 21(3), 344-349.
57. Vončina D., Almeida R. P. (2018). Screening of some Croatian autochthonous grapevine varieties reveals a multitude of viruses, including novel ones. *Archives of virology*, 163, 2239-2243.
58. 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), 262-273.
59. Vončina D., Šimon S., Dermic E., Cvjetković B., Pejić I., Maletić E., Kontić J. K. (2011). Differential properties of Grapevine virus B isolates from Croatian autochthonous grapevine cultivars. *Journal of Plant pathology*, 283-289.
60. Wang M. R., Cui Z. H., Li J. W., Hao X. Y., Zhao L., Wang Q. C. (2018). In vitro chemotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant methods*, 14(1), 1-18.
61. Zdunić G., Preece J. E., Dangl G. S., Koehmstedt A., Mucalo A., Maletić E., Pejić I. (2013). Genetic characterization of grapevine cultivars collected throughout the Dalmatian region. *American journal of enology and viticulture*, 64(2), 285-290.

Popis korištenih poveznica:

1. Aizitili T., Maimaiti Y., Zhixiang Z., Mijiti M. (2023). A novel badnavirus discovered in Fig tree by high-throughput sequencing, available at Research Square <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2454575/v1> - pristup 04.03.2023.
2. Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju. Podaci iz Vinogradarskog registra za 2022. godinu. <https://www.apprrr.hr/registri/> – pristup 03.02.2023.
3. International Organisation of Vine and Wine (OIV). Statistical Report of World Vitiviniculture (2022.). <https://www.oiv.int/what-we-do/global-report?oiv> – pristup 28.01.2023.
4. XLSTAT (2007) Statistical Software for Excel. <https://www.xlstat.com> pristup- 16.05.2023.
5. Fayek M. A., Jomaa A. H., Shalaby A. A. B., Al-Dhaher M. M. A. (2009). Meristem tip culture for in vitro eradication of grapevine leafroll associated virus-1 (GLRaV-1) and grapevine fan leaf virus (GFLV) from infected Flame seedless grapevine plantlets. Scientific Journals of the University of Jaén. Introduction to Research. <https://revistaselectronicas.ujaen.es/index.php/ininv/article/view/303> pristup- 02.04.2023.

Prilog 1. Skraćeni nazivi u tekstu

Skraćeni naziv virusa	Puni naziv virusa
GVG	G-virus vinove loze
GBV-1	Badnavirus vinove loze
GFLV	Virus lepezastog lista vinove loze
ArMV	Virus mozaika gušarke
GLRaV-1	Uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 1
GLRaV-2	Uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 2
GLRaV-3	Uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 3
GVA	A-virus vinove loze
GVB	B-virus vinove loze
GRSPaV	Virus povezan s jamičavosti drva Rupestris-a
GFkV,	Virus šarene pjegavosti lista
GVH	H-virus vinove loze
GVI	I-virus vinove loze
GVJ	J-virus vinove loze
GVK	K-virus vinove loze
GVT	T-virus vinove loze
GVD	D-virus vinove loze
GRLDaV	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus
GPGV	Virus Pinota sivog
GRBV	Grapevine red blotch virus
RNA	Ribonukleinska kiselina
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
BBCH	(Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt Chemische Industrie)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
MS	Murashige i Skoog medij
BAP	benziladenin-citokinin
IAA	indol-3-octena kiselina
PPM	Plant preservation mixture
RT-PCR	lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (real-time PCR)
NaOH	Natrijev hidroksid (sodium hydroxide)
HCl	Klorovodična kiselina
ANOVA	Analysis of variance (analiza varijance)

Prilog 2. Popis tablica, grafova i slika u tekstu

Tablice

Tablica 3.4.1.1. Gospodarski značajni virusi vinove loze i bolesti koje uzrokuju (Ivić i Fazinić 2011.).....	11
Tablica 4.2.1. Genotipovi vinove loze uključeni u istraživanje i njihov sanitarni status.	25
Tablica 4.5.1. Genotipovi vinove loze s brojem unesenih vršnih meristema i datumom unosa u kulturu tkiva.	29
Tablica 5.1.1. Prikaz postotka preživjelih jedinki nakon dva i četiri tjedna u odnosu na broj početnih vršnih meristema unesenih u kulturu tkiva.	35
Tablica 5.1.2. Usporedba srednjih vrijednosti odabranih sorata s obzirom na % izraslih jedinki nakon dva tjedna i % regeneriranih biljaka nakon 4 tjedna.....	36
Tablica 5.2.1. Prikaz dinamike rasta biljaka 5 tjedana nakon unosa u kulturu tkiva.	37
Tablica 5.2.2. Usporedba srednjih vrijednosti visine odabranih sorata.....	38
Tablica 5.2.1.1. Razlika između jedinki zaraženih GVG i GBV-1 s obzirom na % izraslih jedinki nakon 2 tjedna i % regeneriranih biljaka nakon 4 tjedna.	40
Tablica 5.2.1.2. Utjecaj virusne zaraze na visinu biljaka.	41
Tablica 5.3.1. Usporedba broja vršnih meristema unesenih u kulturu, broja regeneriranih biljaka, broja biljaka stavljenih u postupak aklimatizacije i broja aklimatiziranih biljaka.....	44
Tablica 5.4.1. Uspješnost eliminacije virusa kulturom vršnog meristema <i>in vitro</i> na biljkama održavanih u kulturi tkiva 3, 5 i 9 mjeseci.	46
Tablica 5.4.2. Dinamika održavanja biljaka u kulturi tkiva i uspješnost eliminacije virusa kulturom vršnog meristema <i>in vitro</i>	47

Grafovi

Graf 5.1.1. Prikaz broja preživjelih jedinki u drugom i četvrtom tjednu u odnosu na broj unesenih vršnih meristema.....	34
Graf 5.2.1. Visina eksplantata s obzirom na genotip nakon 5 tjedana od unosa vršnih meristema u kulturu tkiva.	38
Graf 5.2.2. Usporedba prosječne vrijednosti visine četiri odabrane sorte.....	39
Graf 5.2.1.1. Usporedba utjecaja sanitarnog statusa s obzirom na postotak izraslih biljaka (2 tjedna) i postotak regeneriranih biljaka (4 tjedna).	41
Graf 5.2.2.1. Utjecaj sorte s obzirom na % izraslih jedinki nakon 2 tjedna i % regeneriranih biljaka nakon 4 tjedna u kulturi tkiva.	43

Slike

Slika 3.1.1. Trend kretanja ukupne proizvodnje, potrošnje i izvoza vina u svijetu.	5
Slika 3.5.2.1. Shematski prikaz kulture meristema.	15
Slika 3.7.1.1. Infekcija G-virusom vinove loze na području Hrvatske. (Brojevima su na karti označene županije). Legenda pokazuje boje s obzirom na postotak zaraze u pojedinoj županiji. (Identifikatori za županije: 1—Požeško-slavonska, 2—Sisačko-moslavačka, 3—Krapinsko-zagorska, 4—Zagrebačka županija, 5—Grad Zagreb, 6—Istarska županija 7—Primorsko-goranska ,8—Ličko-senjska, 9—Zadarska; 10—Šibensko-kninska 11—Splitsko-dalmatinska 12—Dubrovačko-neretvanska).....	19
Slika 3.7.2.1. Infekcija badna virusom vinove loze na području Hrvatske. (Brojevima su na karti označene županije). Legenda pokazuje boje s obzirom na postotak zaraze u pojedinoj županiji. (Identifikatori za županije: 1—Požeško-slavonska, 2—Sisačko-moslavačka, 3—Krapinsko-zagorska, 4—Zagrebačka županija, 5—Grad Zagreb, 6—Istarska županija 7—Primorsko-goranska ,8—Ličko-senjska, 9—Zadarska; 10—Šibensko-kninska 11—Splitsko-dalmatinska 12—Dubrovačko-neretvanska).....	21
Slika 4.2.1. Reznice uzorkovanih genotipova nakon što su stavljene u vodu na pupanje.	25
Slika 4.4.1. Uzorkovanje izraslih mladica (A). Uklanjanje listova sa mladica i uzorkovanje vegetacijskog vrha (B). Vegetacijski vrh vinove loze sa dijelom stabljike i primordijalnim listovima (C).....	27
Slika 4.4.2. Postupak sterilizacije biljnog materijala. Ispiranje vegetacijskih vrhova pod mlazom vode (A). Ispiranje vegetacijskih vrhova u 70 %-tnom alkoholu (B). Ispiranje vegetacijskih vrhova u sterilnoj vodi (C).	28
Slika 4.5.1. Unos vegetacijskih vrhova izdanka u kulturu tkiva (A). Izolacija vrha meristema, uklanjanje dijela stabljike i primordijalnih listova (B).	30
Slika 4.8.1. Biljke vinove loze u komori rasta na aklimatizaciji.	31
Slika 4.8.2. Jedinka odgovarajuće visine i dobro razvijenog korijenovog sustava spremna za postupak aklimatizacije.	32
Slika 4.8.3. Sadnja razvijene <i>in vitro</i> biljke u supstrat (A). Posađena biljka u supstratu spremna za postupak aklimatizacije (B). Biljka u postupku aklimatizacije prekrivena plastičnom čašom odozgo gdje čaša simulira kontrolirane uvjete slične epruveti (C).	32
Slika 5.2.1.1. Prikaz jedinki sorte 'Portan', prva je zdrava od virusa, druga posjeduje zarazu GBV-1 (A). Prikaz jedinki sorte 'Portan', prva i druga jedinka s lijeva su zaražene GBV-1, dvije s desna su zdrave od virusa (B).	40
Slika 5.2.2.1. Utjecaj genotipova na rast i razvoj u kulturi tkiva jedinki zaraženih GBV-1.	42
Slika 5.3.1. Usporedba rasta biljaka različitih genotipova u kulturi tkiva, aklimatizacija se vršila na biljkama odgovarajuće visine sa razvijenim korijenovim sustavom.	44
Slika 5.3.2. Različite reakcije jedinki vinove loze na postupak aklimatizacije. Jedinka vinove loze koja je negativno reagirala na proces aklimatizacije, dolazi do sušenja listova (A). Jedinka koja je uspješno prošla proces aklimatizacije (B). Jedinka koja je odbacila listove i osušila se nakon ulaska u postupak aklimatizacije (C).	45

Životopis

Antonela Gelendir rođena je 11. veljače 1999. godine u Zagrebu. Završava srednju školu smjera Agrotehničar u Agronomskoj školi Zagreb i 2017. godine upisuje studij Agroekologije na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog studija obavlja stručnu praksu na zavodu Vinogradarstvo i vinarstvo u laboratoriju za kulturu tkiva. 2020. godine brani završni rad na temu 'Mikropropagacija hrvatskih autohtonih sorata vinove loze u kulturi tkiva' i stječe akademsku titulu sveučilišne prvostupnice Agroekologije, uz pohvalu *cum laude*. Nakon završetka preddiplomskog studija Agroekologije, upisuje diplomski studij Hortikulture usmjerenja Vinogradarstvo i vinarstvo. Uključuje se u rad izvannastavnih aktivnosti 'Ampelografske grupe', 'Vinarske grupe' i 'Male studentske destilerije', koje djeluju u sklopu Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo. Tijekom diplomskog studija odrađuje stručnu praksu u Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu u Zagrebu, gdje radi na odjelu za senzorna ispitivanja vina. Tijekom studija odrađuje studentski posao u kušaonici vinarije Litteraii. 2022. godine dobiva stipendiju Hrvatske školske zaklade i odlazi na stručnu praksu u Kaliforniju, gdje odrađuje tri mjeseca stručne prakse u vinariji Grgich Hills. Sudjeluje u berbi, preradi grožđa, kemijskim analizama mošta i vina, njezi vina i ostalim poslovima u proizvodnji.