Otpornost sjemenjaka nastalih križanjem ('Grk' × 'Panonia') × 'SK 00-1/8' na plamenjaču vinove loze

Grubišić, Viktorija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

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

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Otpornost sjemenjaka nastalih križanjem ('Grk' × 'Panonia') × 'SK 00-1/8' na plamenjaču vinove loze

DIPLOMSKI RAD

Viktorija Grubišić

Zagreb, siječanj, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Hortikultura Vinogradarstvo i vinarstvo

Otpornost sjemenjaka nastalih križanjem ('Grk' × 'Panonia') × 'SK 00-1/8' na plamenjaču vinove loze

DIPLOMSKI RAD

Viktorija Grubišić

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

Zagreb, siječanj, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Viktorija Grubišić**, JMBAG 0178102410, rođena 01.01.1996. u Zagrebu, izjavljujem

da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Otpornost sjemenjaka nastalih križanjem ('Grk' × 'Panonia') × 'SK 00-1/8' na plamenjaču vinove loze

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Viktorije Grubišić**, JMBAG 0178102410, naslova

Otpornost sjemenjaka nastalih križanjem ('Grk' × 'Panonia') × 'SK 00-1/8' na plamenjaču vinove loze

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____.

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	izv. prof. dr. sc. Darko Preiner	mentor	_____
2.	prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić	član	_____
3.	prof. dr. sc. Edi Maletić	član	_____

Zahvala

Zahvaljujem kolegicama sa Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo, Ivi Šikuten, Petri Štambuk i Valentini Tuščić na pomoći oko terenskog i laboratorijskog dijela diplomskog rada te mentoru Darku Preineru na pomoći i savjetima u svako doba dana te apsolutnoj predanosti u obavljanju svojeg posla koja se, među ostalim, očitovala i u 12-satnoj vožnji do Novog Sada i natrag, kako bi donio svježi polen na vrijeme za oprašivanje.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj istraživanja 2

2. Pregled literature 3

2.1. Plamenjača vinove loze 3

2.2. Molekularno oplemenjivanje vinove loze 4

2.3. Čimbenici otpornosti na plamenjaču 6

2.3.1. R-lokusi 7

2.4. Postupak hibridizacije na otpornost 8

2.4.1. Postupci za prekid dormantnosti sjemena vinove loze 10

3. Materijali i metode 10

3.1. Lokacija i vrijeme istraživanja 11

3.2. Biljni materijal 12

3.2.1. Genotip 'SK 00-1/8' 12

3.3. Postupak križanja 13

3.4. Berba i odvajanje sjemenki 14

3.5. Stratifikacija 15

3.6. Naklijavanje i sjetva u kartone 16

3.7. Modificirani poljski uvjeti za evaluaciju otpornosti na plamenjaču 17

4. Rezultati i rasprava 18

4.1. Prinos sjemena 18

4.2. Dinamika klijanja 18

4.3. Vizualna evaluacija otpornosti na plamenjaču 21

5. Zaključak 25

6. Popis literature 26

7. Prilozi 31

Životopis 33

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Viktorije Grubišić**, naslova:

Otpornost sjemenjaka nastalih križanjem ('Grk' × 'Panonia') × 'SK 00-1/8' na plamenjaču vinove loze

Tradicionalne sorte vinove loze (*V. vinifera* L) iznimno su osjetljive na velik broj bolesti i štetnika, a njihov se konvencionalan uzgoj dovodi u pitanje održivosti, obzirom na sve izraženije globalne klimatske promjene i negativan utjecaj koji ostavlja na okoliš. Na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, 2015. godine je pokrenut prvi oplemenjivački program na vinovoj lozi s ciljem stvaranja kvalitetnih vinskih sorata s poligenskom otpornošću prema gljivičnim bolestima. Ovaj rad opisuje postupak dobivanja F2 generacije križanja hrvatskih autohtonih sorata s donorima gena otpornosti, kao i rezultate evaluacije uzgojenih sjemenjaka na otpornost prema plamenjači vinove loze (*P. viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et de Toni) pomoću OIV deskriptora u modificiranim poljskim uvjetima. Evaluacijom je odabrano 54 sjemenjaka s visokom razinom otpornosti koji će se koristiti u daljnjim koracima ovog programa.

Ključne riječi: oplemenjivanje (hibridizacija), vinova loza, otporne sorte, plamenjača vinove loze

Summary

Of the master's thesis – student **Viktorija Grubišić,** entitled

Resistance of the seedlings from the cross of ('Grk' × 'Panonia') × 'SK 00-1/8' on grapevine downy mildew

Traditional grapevine varieties (*V. vinifera* L) are exceedingly susceptible to a large number of pests and diseases and the sustainability of their conventional cultivation is questionable, given the increasingly pronounced global climate change and the negative impact it has on the environment. In 2015, the first grapevine breeding program was launched at the University of Zagreb Faculty of Agriculture, to create quality wine varieties with polygenic resistance towards fungal diseases. This paper describes the process of obtaining an F2 generation of crossing between the native Croatian varieties and resistance gene donors, as well as the results of the evaluation of cultivated seedlings for resistance to grapevine downy mildew (*P. viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et de Toni) using OIV descriptors in modified field conditions. The evaluation resulted in a selection of 54 seedlings with a high level of resistance for use in the further steps of this program.

Keywords: breeding (hybridization), grapevine, resistant varieties, downy mildew

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) možda nije najviše rasađena voćna vrsta na svijetu, niti je najznačajnija u kontekstu rješavanja problema svjetske gladi, no njezin glavni proizvod – vino ima itekako dugu i bogatu povijest, kao i nezamjenjivu tradicionalnu i kulturnu ulogu u mnogim zemljama. Vino je u pojedinim društvima statusni simbol, a njegova se kvaliteta zbog različitih čimbenika poput tradicije i marketinga, primarno veže uz sortu od koje je nastalo. Zbog navedene činjenice, dan danas 50% ukupnih vinogradarskih površina zauzimaju 33 tradicionalne sorte, iako se brojka poznatih sorata vinove loze kreće oko 10.000 (OIV, 2017.). Vinogradarska proizvodnja čini iznimno nepovoljan ekološki utjecaj na okoliš radi korištenja velikog broja sredstava za zaštitu bilja kako bi se omogućio uzgoj ove osjetljive biljne vrste. Uz sve prisutnije globalne klimatske promjene i rast ekološke osviještenosti populacije, postavlja se pitanje: koliko je ovaj način proizvodnje održiv?

Od trenutka pojave filoksere (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) i najvažnijih (*pseudo)*gljivičnih bolesti – plamenjače (*Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et de Toni) i pepelnice (*Erysiphe necator* Schwein.) vinove loze krajem 19. stoljeća u Europi, oplemenjivači ulažu značajne napore u stvaranje novih „sorata s otpornošću na gljivične bolesti“, hibridizacijom plemenite vinove loze s ostalim vrstama roda *Vitis* koje imaju urođenu genetsku otpornost (Eibach i Töpfer, 2015.). Ovi postupci, tzv. klasične oplemenjivačke tehnike, prisutni su više od stoljeća jer je odmah prepoznato kako je genetska otpornost jedino dugotrajno i održivo rješenje. Brojni oplemenjivački programi su dosad rezultirali s više tisuća registriranih međuvrsnih križanaca u *Vitis* internacionalnom katalogu (https://www.vivc.de), no još uvijek nisu u zadovoljavajućoj mjeri zastupljeni u proizvodnji, posebice u zemljama „starog svijeta“ (Palumbo i sur., 2019.). Razlozi su za to konzervativan i tradicionalan stav zakonodavaca, ali i proizvođača i potrošača vina, koji nisu skloni prihvaćanju novog sortimenta (Grubišić i Preiner, 2020.). Europsko vijeće primjerice, člankom 93 iz regulative 1308/2013, ne dozvoljava proizvodnju vina sa Zaštićenom oznakom izvornosti (ZOI) od međuvrsnih križanaca stoga će se i manji broj vinogradara odlučiti za sadnju nepoznatih sorata s kojima ne mogu izvući zadovoljavajuću ekonomsku korist ili čija se vina potencijalno neće kupovati.

Osim klasičnih oplemenjivačkih tehnika, napretkom znanosti posljednjih godina pojačano se razvijaju molekularni i biotehnološki alati i metode koji omogućuju mnogo brže i učinkovitije načine za oplemenjivanje vinove loze. Neke su, poput implementacije molekularnih markera u klasični oplemenjivački program, objeručke prihvaćene i danas uvedene u široku uporabu, no druge, poput modifikacija na razini genoma, nailaze na otpor javnosti, zabrinute zbog nepoznatih učinaka takvih organizama na ljudsko zdravlje i okoliš. Europska unija prema odluci 2001/18/EC brani puštanje genetski modificiranih i/ili uređenih biljaka u promet, čak i ako prilikom stvaranja nije korištena nikakva strana DNK. Potencijalnih rješenja za održivi razvoj i opstanak vinogradarstva ima napretek, a svakim danom postaju dostupne nove tehnike i metode koje iskazuju nove mogućnosti u stvaranju sorata tijekom praktičnog vremenskog roka, koje će odgovoriti na zahtjeve potrošača, kao i potrebu za smanjenjem uporabe pesticida (2009/128/EC) i prilagodbu na klimatske promjene. Potreban

je doduše, izniman napor u edukaciji zakonodavaca i šire javnosti, odnosno svih „karika vinskog lanca“; ali i odlični rezultati vina proizvedenih od takvih sorata, kako bi se odstranila dosad uvriježena mišljenja i uvjerilo u sigurnost za njihovo korištenje i činjenicu kako one donose nemjerljivo više prednosti od laički smatranih mana.

Hrvatska je mala zemlja koja se ponosi sa svojom višestoljetnom vinogradarsko-vinarskom tradicijom i velikim brojem autohtonih sorata o čemu svjedoče Maletić i sur. (2015a; 2015b). Jedna od strategija za isticanje i prepoznatljivost hrvatskih vina na svjetskom tržištu je upravo fokus na kvalitetu i autohtonost. Iz tog su se razloga djelatnici Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu 2015. godine upustili u vlastiti oplemenjivački program na vinovoj lozi korištenjem markerima potpomognute selekcije (eng. *Marker assisted selection*, MAS). Cilj je tog programa stvaranje kvalitetnih vinskih sorata s otpornošću na gljivične bolesti prilagođenih za uzgoj u hrvatskim agroekološkim uvjetima, a za sorte dobivene navedenom tehnikom, smatra se da će biti brže i lakše uvedene u proizvodnju. U prvom koraku križanja, odabrane su dvije autohtone sorte 'Grk' i 'Dišeća ranina', koje uz funkcionalno ženski cvijet karakterizira visok kvalitativni potencijal (Maletić i sur., 2015a) koje su križane s otpornom sortom 'Panonia' radi nasljeđivanja u njoj prisutnih gena za otpornost na plamenjaču i pepelnicu Rpv3, Rpv12 i Ren3. Poučeni iskustvima ostalih kolega oplemenjivača te informacijama dostupnim u literaturi kako pojedini sojevi patogena mogu prevladati genetsku otpornost (Peressoti i sur., 2010.; Feechan i sur., 2013.), fokus je na uspješnoj „piramidizaciji“ većeg broja gena, kako bi njihova otpornost bila što šira i dugotrajnija. Nakon prvog koraka križanja, iz populacije sjemenjaka izdvojeno je 11 genotipova koji su naslijedili sve gene od interesa, kao i funkcionalno ženski cvijet (Hapač, 2020.) koji su sudjelovali u drugom koraku križanja s donorom dodatnih gena otpornosti, opisanom u ovom radu.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj je ovog istraživanja provesti križanje 11 odabranih genotipova F1 generacije 'Grk' × 'Panonia' (GRP) i 'Dišeća ranina' x 'Panonia' (DRP) s genotipom 'SK 00- 1/8' koji posjeduje gene otpornosti na pepelnicu Run1 i Ren3 te Rpv1 na plamenjaču, uzgojiti sjemenjake te utvrditi njihovu otpornost na plamenjaču vinove loze metodom evaluacije pomoću OIV deskriptora, u modificiranim poljskim uvjetima uz navodnjavanje kišenjem.

Budući je cilj ovog programa doći do jedinki koje su ovim križanjima naslijedile sve gene otpornosti (3 prema plamenjači i 2 prema pepelnici) koje će se koristiti za daljnje oplemenjivanje.

2. Pregled literature

2.1. Plamenjača vinove loze

Plamenjača vinove loze obligatni je biotrofni biljni patogen koji parazitira na vinovoj lozi, kao i ostalim vrstama porodice *Vitaceae* (CABI/ISC, 2019.). Eukariotski je organizam koji je taksonomski svrstan u razred algašica (lat. *Oomycetes*), a smatra se uzročnikom jedne od najvažnijih bolesti na vinovoj lozi diljem svijeta (Dussert i sur., 2019.). Kamoun i sur. (2015.) su proveli anketu o deset najznačajnijih biljnih patogena iz navedenog razreda, ovisno o njihovom znanstvenom i ekonomskom utjecaju te je *P. viticola* zauzela šesto mjesto. Prvi je put pronađena i opisana na sjeveroistoku SAD-a, a u Europu je slučajno introducirana 1878. godine nakon čega je bila uzrokom značajnih gubitaka u prinosu, prije otkrića bakrenih preparata koji su još uvijek u velikim količinama prisutni u proizvodnji (Gessler i sur., 2011.).

Wong i sur. (2001.), navode kako životni ciklus plamenjače ima dvije faze; fazu nespolnog razmnožavanja tijekom vegetacijskog perioda biljke i fazu u kojoj se spolnim razmnožavanjem (stvaranjem oospora) u jesen osigurava prezimljavanje patogena. Isti su autori dokazali kako je plamenjača heterotaličan organizam, odnosno za uspješno spolno razmnožavanje zahtijeva 2 diploidne jedinke različitog tipa parenja. Arens (1929.) iz Gessler i sur. (2011.) je uočio kako su oospore zaslužne za primarnu infekciju vinove loze. Prema Gessler i sur. (2011.) oospore sazrijevaju tijekom zime i u novoj vegetacijskoj sezoni, rastom temperature tla iznad 12 °C, uz visoku koncentraciju vlage u zraku, klijaju i formiraju sporangije (sporangiofore), koji su u povoljnim klimatskim uvjetima zaslužni za brojne sekundarne infekcije stvaranjem zoospora. Fröbel i Zyprian (2019.) navode kako se infekcija biljke domaćina odvija „encistiranjem“ zoospora na rubovima puči koje puštaju haustorije u međustanične prostore biljke, a svojim su radom potvrdili da uz listove, plamenjača može napasti i lisne peteljke, vrhove mladica, mlade bobice i sjemenke. Prema Buonassisi i sur. (2017.), prvi su vidljivi simptomi plamenjače tzv. „uljne mrlje“ na licu listova koje kasnije nekrotiziraju, a prilikom zadovoljenih uvjeta za sporulaciju (relativna vlaga zraka oko 93% i temperatura između 18 i 20 °C) ista je vidljiva na naličju listova, kao i površini vitica, cvatova i mladih bobica. Slike 2.1.1. i 2.1.2. prikazuju opisane simptome na pojedinim organima vinove loze.



Slika 2.1.1. Tipične uljne mrlje na licu listova

Izvor:https://www.cabi.org/isc/portfolio/compendia/normal/9185.img ©Megan M. Kennely



Slika 2.1.2. Sporulacija na naličju lista

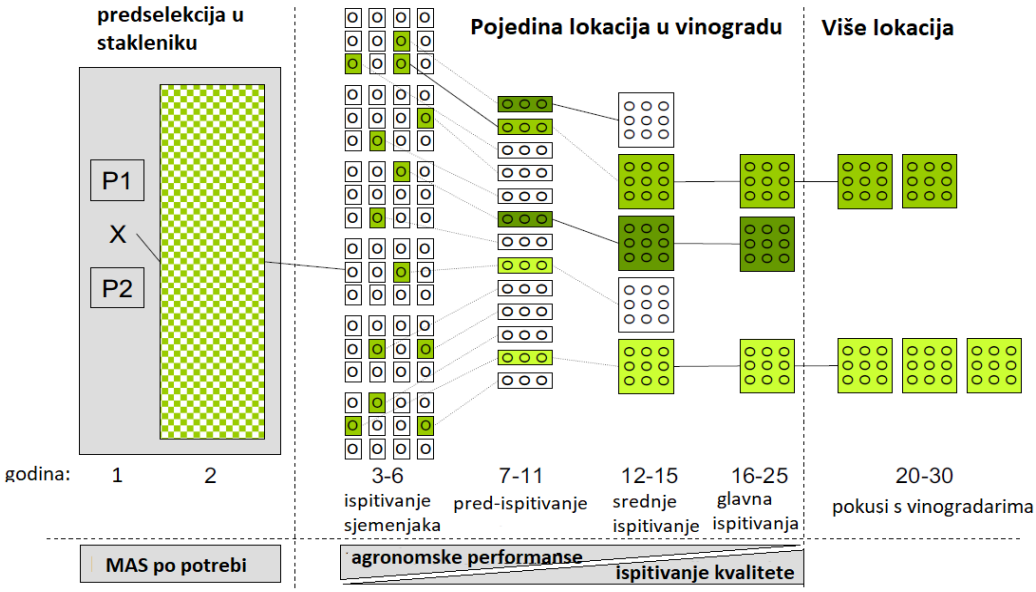
Izvor:https://www.cabi.org/isc/portfolio/compendia/normal/9190.img ©Megan M. Kennely

Plamenjača uzrokuje izravne štete napadom na bobice (smanjujući prinos), ali i višestruke neizravne štete koje se očituju u smanjenju lisne asimilacije, slabijem odrvenjavanju rozgve i zametanju cvjetnih pupova, kao i slabijoj produkciji drva, što utječe i na naredne vegetacijske sezone ukoliko se ne dovede pod kontrolu fungicidima. Madden i sur, (2000.); Rossi i Caffi (2012.) iz Kamoun i sur. (2015.), navode kako u slučaju povoljnih klimatskih uvjeta i bez uporabe adekvatnih sredstava za zaštitu, plamenjača u samo jednoj sezoni utječe na smanjenje prinosa do 75%. Delmas i sur. (2016.; 2017.) su utvrdili kako plamenjača ima veliku sposobnost prilagodbe zbog prisustva spolnog razmnožavanja tj. rekombinacije gena u godišnjem ciklusu, jer brzo razvija otpornost na fungicide, a u relativno kratkom vremenskom periodu mogla bi prevladati i genetsku otpornost djelomično otpornih sorata.

2.2. Molekularno oplemenjivanje vinove loze

Vinova loza je višegodišnja biljna vrsta koja, jednom posađena u vinograd, u njemu ostaje više desetljeća. Uzevši u obzir navedenu činjenicu, ali i onu kako je kvaliteta njezinih plodova rezultat kompleksne interakcije mnogih čimbenika poput genotipa, položaja, klime i sustava uzgoja; jasno je kako je oplemenjivanje takve kulture veoma dugotrajan i složen proces. To je još više izraženo u slučaju oplemenjivanja na otpornost prema bolestima i štetnicima što su kvantitativna svojstva, čija je ekspresija rezultat kontrole većeg broja gena manjeg pojedinačnog učinka (Maletić i sur., 2008.).

Klasični oplemenjivački programi na vinovoj lozi, prije razvoja adekvatnih genetičkih alata i otkrića molekularnih markera, trajali su između 25 i 30 godina (Eibach i Töpfer, 2015.) Razlozi za to su, uz navedeni životni vijek biljke: potreba za višegodišnjim ispitivanjima križanaca kako bi se utvrdila stabilnost i ekspresija njihovih svojstava u različitim okolinskim uvjetima, ograničena količina izvora otpornosti i spora vegetativna propagacija putem reznica (Töpfer i sur., 2011.). Isti autori navode kako je glavna strategija oplemenjivanja vinove loze na otpornost prema biotičkim stresorima introgresija čimbenika otpornosti iz divljih vrsta *Vitisa*, nakon čega slijedi uzastopno *pseudo*-povratno križanje sa plemenitom vrstom *V. vinifera* kako bi se izbjegla inbreeding depresija. Povratna se križanja najčešće provode do 4. ili 6. BC-generacije kada je teoretski obnovljeno 96,9 – 99,2% genoma rekurentnog roditelja (Collard i sur, 2005.), a broj generacija u oplemenjivačkom programu ovisi o sličnosti roditeljskih parova i količini nepovoljnih svojstava koja bi se mogla prenijeti uz gene otpornosti (Beljo, 2012.). Samo križanje uzima malo vremena u usporedbi s ostalim aktivnostima oplemenjivačkog programa. Prema Eibach i Töpfer (2015.) u početnim je fazama razvoja sjemenjaka fokus na evaluaciju otpornosti na bolesti, a potom ostalih važnih karakteristika. Dolaskom u odgovarajući stadij razvoja, slijedi njihovo vegetativno razmnožavanje, a pojavom pune rodnosti nakon par godina se kreće sa evaluacijom kvalitativnih svojstava njihovih vina. Nakon navedenog, istražuje se interakcija genotipa i okoline, odnosno ostvareni rezultati se potvrđuju na više različitih lokacija i u različitim okolišnim uvjetima, kako bi se mogla registrirati nova sorta. Shema je takvog programa prikazana na Slici 2.2.1.



Slika 2.2.1. Shema oplemenjivačkog programa na vinovoj lozi

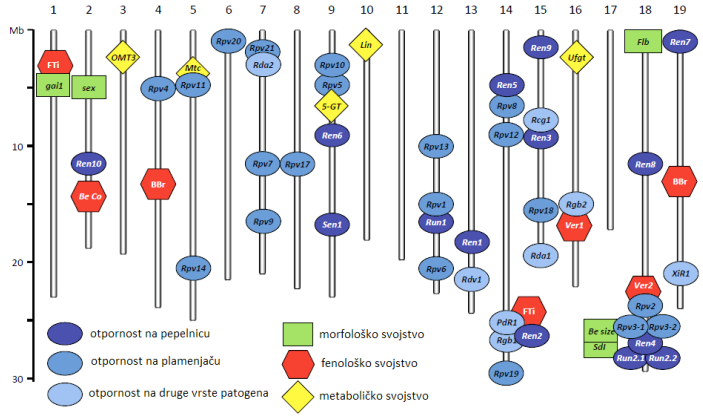
Izvor: Töpfer, R., Hausmann, L., Harst, M., Maul, E., Zyprian, E., Eibach, R., (2011) New Horizons for Grapevine Breeding 5. 79-100

Otkriće molekularnih markera povezanih na lokuse otpornosti, omogućilo je provođenje selekcije roditeljskih parova i potomstva na temelju gena od interesa, a ne na temelju fenotipskih opažanja, što je uvelike ubrzalo i povećalo učinkovitost selekcije, ali i samih oplemenjivačkih programa (Ben-Ari i Lavi, 2012.; Eibach i Töpfer, 2014.). Dodatne su prednosti markerima potpomognute selekcije (MAS) ušteda vremena i prostornih resursa zamjenom pojedinih poljskih pokusa molekularnim testovima, selekcija genotipova u najranijim fazama rasta, izbjegavanje prenošenja nepoželjnih ili štetnih gena, tzv. „*linkage drag*“ u potomstvo, selekcija svojstava niske heritabilnosti, mogućnost ispitivanja specifičnih svojstava kod kojih fenotipska procjena nije izvediva i „piramidizacija“ gena iz više izvora u jedinstvenoj jedinci (Collard i sur, 2015.). MAS je pristup kojim se maksimalno mogu iskoristiti postojeći genetski resursi (Ben-Ari i Lavi, 2012.).

Piramidizacija gena za otpornost je u srži nakupljanje više alela otpornosti u jedinstvenom genotipu koja će osigurati dugotrajniju i širu otpornost prema većem broju različitih sojeva patogena. Učinkovitost piramidizacije gena i molekularnog oplemenjivanja ovisi o količini gena koja se prenosi, genetskoj osnovi svojstava, tipovima korištenih markera, udaljenosti markera od ciljanog gena, genetskoj pozadini u koju se unosi željeni gen, tipovima molekularnih markera i raspoloživim alatima kojima se isto može odraditi (Weeden i sur., 1992.; Francia i sur., 2005. navedeno u Joshi i Nayak, 2010.). Korištenjem MAS-a, danas je moguće stvoriti otporne sorte s poligenskom otpornošću prema gljivičnim bolestima i odličnom kvalitetom vina u roku od 15 godina (Schneider i sur., 2019.).

2.3. Čimbenici otpornosti na plamenjaču

Otkrićem i razvojem molekularnih i biotehničkih alata u posljednjih je dvadesetak godina uvelike doprineseno znanju o interakciji između plamenjače i vinove loze, kao i identifikaciji i funkcionalnoj karakterizaciji važnih gena i povezanih molekularnih markera koji potiču različite mehanizme obrane (Buonassisi i sur., 2017.; Delrot i sur., 2020.). Dugogodišnjim proučavanjem genoma vinove loze, divljih vrsta i međuvrsnih križanaca, identificiran je velik broj lokusa za kvantitativna svojstva (eng. *Quantitative trait loci, QTL*), među kojima su gen lokusi otpornosti prema *P. viticoli*, ostalim bolestima i štetnicima, ali i oni za važna agronomska svojstva; kao rezultat međunarodnog truda znanstveno-istraživačke zajednice. Dosad otkriveni QTL-ovi, uključujući njihove pozicije na kromosomima vinove loze, prikazani su na Slici 2.3.1., a njihovi puni nazivi i opisi dostupni su u Prilogu 2**.**



Slika 2.3.1. Pozicije dosad otkrivenih QTL-ova u genomu vinove loze

Izvor: Delrot, S., Grimplet, J., Carbonell-Bejerano, P., Schwandner, A. i sur. (2020). Genetic and Genomic Approaches for Adaptation of Grapevine to Climate Change. In: Kole C. (eds) Genomic Designing of Climate-Smart Fruit Crops. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97946-5_7.

Međunarodna suradnja i javno dijeljenje rezultata na ovim područjima (primjerice: https://www.vivc.de/index.php?r=loci%2Findex) ukazuje na pojačan fokus znanstvenika diljem svijeta s istim ciljem: stvaranja otpornih sorata koje će omogućiti održavanje ekološki osviještenije vinogradarsko-vinarske proizvodnje u budućnosti. U prilog tome ide i činjenica kako je od 2003. godine do danas identificiran 31 Rpv gen-lokus za otpornost na plamenjaču (eng. ***R****esistance to* ***P. v****iticola*) iz različitih genetskih izvora (popisani u Prilogu 1), od kojih je 16 opisano u posljednje četiri godine, odnosno sedam unatrag šest mjeseci (Maul i sur. 2021. - Vitis International Variety Catalogue - www.vivc.de ; Fu i sur., 2020.; Sargolzaei i sur. 2020.).

Qiu i sur. (2015.) opisuju dva glavna mehanizma biljaka u obrani od biotrofnih patogena: jedan se sastoji od otpornosti staničnih stijenki i membrana na penetraciju spora i razvoj haustorija, a drugi se odnosi na programiranu smrt napadnutih stanica (PCD), čime se onemogućava daljnji rast i razvoj patogena. Drugi je spomenuti mehanizam poznatiji pod nazivom „odgovor preosjetljivosti“ (eng. *Hypersensitive response,* HR) koji je pod utjecajem velikog broja čimbenika i još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (Bellin i sur., 2009.; Bashir i sur., 2013.; Boso i sur., 2014.; Divilov i sur, 2018.). Prema Dangl i sur. (2013.) dva su osnovna

međusobno povezana oblika urođenih imunoloških odgovora biljnih stanica: imunost potaknuta molekularnim uzorcima povezanih s patogenom (eng. *pathogen triggered immunity*, PTI) i imunost potaknuta efektorima (eng. *effector triggered immunity*, ETI) od čega PTI čini tzv. „prvu liniju obrane“ koju virulentniji sojevi patogena mogu zaobići lučenjem tvari koje nazivamo efektorima, nakon čega su biljke razvile spomenutu ETI. Uz HR, invazija plamenjače u vinovoj lozi potiče iduće reakcije: povećanu sintezu i akumulaciju stilbena, fitoaleksina i proteina povezanih s patogenezom (PRR), stvaranje papila i tiloza te lignifikaciju (Yu i sur., 2012.).

2.3.1. R-lokusi

Rpv1 je prvi otkriveni i funkcionalno okarakterizirani lokus otpornosti na plamenjaču, introduciran u genom *V. vinifere* višestrukim povratnim križanjima iz *Muscadinie rotundifolie*, a usko je povezan s lokusom otpornosti na pepelnicu Run1 s kojim se najčešće zajednički prenosi u potomstvo (Pauquet i sur., 2001.; Feechan i sur., 2013.). „Rpv1 je NB-LRR receptor, uključen u prepoznavanje patogena i prijenos signala tijekom inicijacije biljne obrane“ (Eisenmann i sur., 2019.). Rpv3 lokus je prvi put pronađen analizom QTL-ova u molekularnoj mapi otporne sorte 'Regent' (Fischer i sur., 2004.; Welter i sur., 2007.) te pruža značajnu razinu otpornosti prema plamenjači i na listovima i bobicama, uzrokujući HR na mjestima infekcije u roku 48 h od inokulacije (Bellin i sur., 2009.). Sánchez-Mora i sur. (2017.) su u svojem istraživanju utvrdili kako Rpv3 u usporedbi s lokusom Rpv1 ima veći doprinos otpornosti biljaka, no kombinacijom oba lokusa u potomstvu, oni iskazuju djelomično i aditivno djelovanje te su pokazali do 88,9% veću kontrolu napada plamenjače u usporedbi s osjetljivim genotipovima i onima koji su naslijedili samo jedan od navedenih lokusa.

Eisenmann i sur. (2019.) su istraživali mehanizam obrane biljaka s Rpv3 lokusom i uz HR, odnosno PCD koja je nastupila 32 h po inokulaciji, primijetili su značajnu akumulaciju trans-resveratrola i fungitoksičnih stilbena (ε-viniferina i trans-pterostilbena) u roku 24 h od inokulacije plamenjačom, što je rezultiralo smanjenim rastom i razvojem patogena. Venuti i sur. (2013.) svojim istraživanjem također potvrđuju kako zajednička introgresija više lokusa (u njihovom slučaju Rpv3 i Rpv12, podrijetlom iz *V. amurensisa*) iskazuje pozitivne učinke piramidizacije, jer su genotipovi heterozigotni na oba alela puno efikasnije ograničavali rast plamenjače od onih samo s jednim ili nijednim od navedenih lokusa otpornosti, uz činjenicu kako Rpv12 pruža otpornost listova na sojeve koji su prevladali otpornost biljaka s Rpv3 lokusom. Zini i sur. (2019.) rezultatima svojih istraživanja pokazuju kako piramidizacija većeg broja R-lokusa (ako je u biljci prisutan lokus za visoku/potpunu otpornost) ne mora nužno povećati ukupnu otpornost na plamenjaču, ali jamči dodatne prepreke u slučaju da virulentni sojevi prevladaju prvu, što je dokazano i u primjeru autora Venuti i sur. (2013.). Iako sva 3 opisana gen lokusa iskazuju slične mehanizme obrane, posebice Rpv3 i Rpv12 (indukcijom HR-a na mjestu infekcije) metabolička i transkriptomička istraživanja pokazuju različitu ekspresiju od 432 do 2042 gena nakon inokulacije plamenjačom u usporedbi s osjetljivim sortama (Eisenmann i sur., 2019.; Chitarrini i sur., 2020.).

Djelomično otporne i otporne sorte uspješno ograničavaju rast i razvoj plamenjače tijekom vegetacije (kontrolom rasta sporangija), no istraživanja pokazuju kako mehanizmi obrane nemaju utjecaja na spolno razmnožavanje ovog patogena (Bellin i sur., 2009., Delmas i sur., 2016; Delbac i sur. 2019.; Chitarrini i sur., 2020.). Zbog navedene činjenice se uzgojem otpornih sorata na gljivične bolesti u vinogradima ipak ne preporuča u potpunosti izostaviti korištenje sredstava za zaštitu bilja, no na primjeru francuskog nacionalnog opservatorija OSCAR, vidljivo je kako je uzgojem takvih sorata moguće smanjiti količinu tretiranja za 80% (Guimier i sur., 2019.). Kombinacijom integrirane zaštite bilja, dobre agronomske prakse i uzgoja otpornih sorata (Pertot i sur., 2016.), ili implementacijom otpornih sorata u ekološku proizvodnju (Pedneault i Provost, 2016.), svakako se može očekivati smanjenje negativnog ekološkog otiska vinogradarstva u budućnosti.

2.4. Postupak hibridizacije na otpornost

Od samih početaka oplemenjivačkih aktivnosti na vinovoj lozi, glavni su ciljevi kombinacija visoke otpornosti na glavne patogene i prilagodbe na klimatske promjene s visokom kvalitetom vina od dobivenih sorata (Yobrégat, 2018.). Iako još uvijek nije istražena sva germplazma vinove loze, izvori otpornosti su se tijekom prošlosti istraživali u sjevernoameričkim i azijskim vrstama poput *V. labrusca, V. aestivalis, V. riparia, V. rotundifolia* i *V. amurensis,* a 2020. godine su prvi puta opisana tri nova lokusa otpornosti na plamenjaču u germplazmi *V. vinifere* (Sargolzaei i sur., 2020.). Delrot i sur. (2020.) navode kako se odabirom superiornih roditeljskih genotipova za križanje smanjuje potreba za piramidizacijom poželjnih alela s različitih lokusa što u konačnici olakšava proizvodnju poboljšanih sorata u manjem broju povratnih križanja. Eibach i Töpfer (2015.) u osnovi dijele sve aktivnosti oplemenjivačkog programa u tri faze: uspostavljanje genetske varijacije križanjem, selekcija potomstva i evaluacija selekcioniranih jedinki.

Postupak umjetne hibridizacije započinje odabirom adekvatnog roditeljskog para, nakon čega slijedi umjetno oprašivanje, zrioba plodova, berba i izdvajanje sjemenki iz grožđa te daljnji postupci kojima će se sjeme pripremiti za sjetvu u narednoj vegetacijskoj sezoni. Vinovu lozu karakteriziraju tri tipa cvjetova, a dvospolan cvijet (koji posjeduje i tučak i prašnike) nalazimo kod većine sorata *V. vinifere* (Coito i sur., 2019.). Vrste cvjetova vinove loze prikazane su na Slici 2.4.1.



Slika 2.4.1. Izgled cvjetova vinove loze (s lijeva na desno: morfološki dvospolan, a funkcionalno ženski, dvospolan cvijet i muški cvijet)

Izvor: https://lh3.googleusercontent.com/proxy/HRNkkzggfisF9jaqxfUFbvLZO5bKi9YLHo5naNdyr05JenRs3l-VtDKZTNbus9m_OgWk9Lfk1ncOWzfiTA_kAq3_sDGVvHPkO4092DRfFKK7TsXL

Posjedovanje dvospolnog cvijeta znači da kod takvih sorata može doći do samooplodnje, koja je u postupku umjetne hibridizacije nepoželjna i kako bi se izbjegla, cvjetove roditeljske biljke koja se u križanju koristi kao „majka“ potrebno je podvrgnuti izrazito napornom i zahtjevnom postupku emaskulacije kao i izolacije od nenamjerne samo- ili stranooplodnje (Reisch, 2001.; Vokurka, 2006.; Eibach i Töpfer, 2015.). Korištenjem sorata s funkcionalno ženskim cvijetom kao majke u ovoj fazi oplemenjivačkog programa postupak emaskulacije se može u potpunosti izbjeći (Cindrić, 1981.; Reisch, 2001.), jer je u velikom broju slučajeva polen sa njihovih prašnika sterilan (Stupić i sur., 2019.) stoga nije potrebno njihovo uklanjanje sa cvjetova prije oprašivanja. Prvi je postupak umjetnog oprašivanja priprema majčinskih biljaka dva do tri dana prije otvaranja njihovih cvjetova, kada se provodi njihova izolacija kako bi se spriječila neželjena stranooplodnja, a istovremeno se sa cvatova uklanjaju već otvoreni cvjetovi (Vokurka, 2006.). Cindrić (1981.) navodi kako se cvatovi majčinskih biljaka sa funkcionalno ženskim cvijetom mogu prorijediti i izolirati i 8 do 10 dana prije početka cvatnje. Izolacija se radi najčešće zatvaranjem cvatova u prozračne papirnate vrećice ili druge materijale koji sprječavaju zagrijavanje uslijed sunčevog zračenja, a postojani su ukoliko se pojave oborine (Reisch, 2001.; Eibach i Töpfer, 2015.). Optimalno vrijeme za provedbu umjetnog oprašivanja je pojava sluzi na njuškama tučaka koja osigurava lakše primanje i klijanje polenovih cijevi (Cindrić 1981.). Kako bi se osigurala ujednačenija oplodnja većeg broja cvjetova i poboljšalo zametanje plodova, Eibach i Töpfer (2015.) preporučaju uklanjanje vršnih i postranih dijelova cvatova, kao i vrškova rodnih mladica te višekratnu provedbu oprašivanja u razmacima od par dana. Ukoliko roditeljski par nije usklađen u vremenu cvatnje (kada se oprašivanje može provesti direktno cvatom očinske biljke), prethodno sakupljeni polen se može nanijeti na njuške tučaka različitim alatima ili prstima, no najčešće se koriste mekani kistovi (Reisch, 2001.; Vokurka, 2006.). Slika 2.4.2. prikazuje postupak oprašivanja vinove loze polenom pomoću kista.



Slika 2.4.2. Oprašivanje vinove loze prethodno sakupljenim polenom
Izvor:http://www.hort.cornell.edu/reisch/grapegenetics/breeding/PollenBrush2.jpg

Iako su sjemeni zametci grožđa u potpunosti razvijeni s početkom šare, berba grozdova se preporuča u fazi fiziološke zrelosti, zbog jednostavnijeg odvajanja sjemenki od ostalih dijelova plodova uz to što se u navedenom trenutku očekuje njihova maksimalna klijavost (Eibach i Töpfer, 2015.). Obzirom kako u trenutku fiziološke zrelosti plodova sjemenke karakterizira nemogućnost klijanja, čak i ako se nađu u povoljnim uvjetima zbog svojstva koje nazivamo primarna dormantnost, sjemenke je potrebno podvrgnuti nekom od postupaka za

skraćivanje tog perioda te osiguravanje bržeg i ujednačenijeg klijanja kojeg nazivamo stratifikacija (Beweley, 1997.; Vokurka, 2006.).

2.4.1. Postupci za prekid dormantnosti sjemena vinove loze

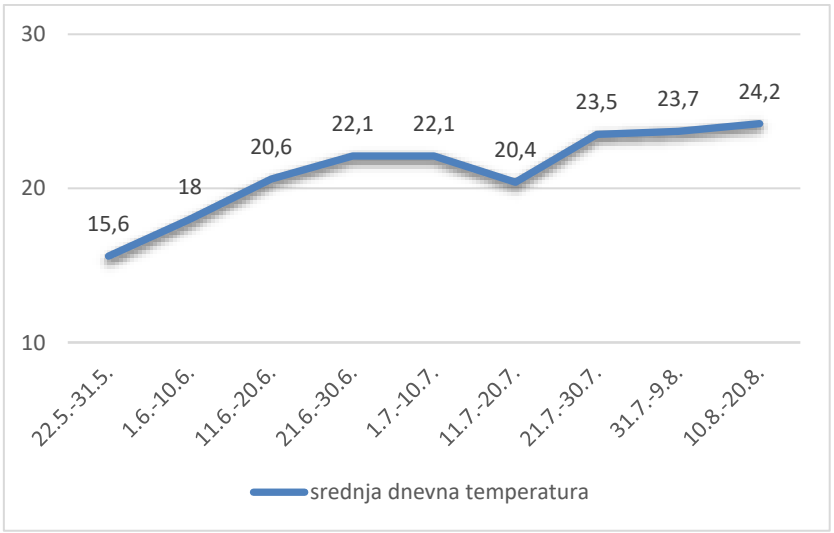
Prema Bradbeeru (1988.) glavni su načini za prekid dormantnosti sjemena većine biljnih vrsta pojedinačnim čimbenicima poput hlađenja, suhog skladištenja na povišenim temperaturama, izlaganja svijetlu, ispiranja, skarifikacije i tretiranjem različitim kemikalijama te izlaganjem promjenjivim uvjetima ili kombinaciji više različitih čimbenika, a navodi kako je posljednji, u većini slučajeva najuspješniji. Pregledom literature za prekid dormantnosti kod različitih voćnih vrsta, Čmelik i Perica (2007.) navode kako najbolji uspjeh ima hladna stratifikacija u trajanju 50 – 150 dana. Ellis i sur. (1983.) navode kako je izlaganje nabubrenog sjemena vinove loze temperaturama između 0 i 5 °C u periodu 8 – 12 tjedana samo umjereno uspješno u prekidu njihove dormantnosti te u svom istraživanju navode istraživanje Singha (1961.), koji je stratificirao sjemenke 14 križanaca vinove loze pri 5 °C tijekom 12 tjedana, rezultirajući sa 8 – 62% klijavosti (srednja vrijednost 40%). Thaipong i sur. (2007.) su istraživali optimalan period trajanja hladne stratifikacije za sjemenke vinove loze pri 5 °C, čiji su rezultati pokazali maksimalno 41% klijavosti nakon 90 i 105 dana ovakvog tretmana dormantnih sjemenki. Navode također kako klijavost sjemenki pada produljenjem perioda stratifikacije nakon postignutog maksimalnog postotka. Za potrebe oplemenjivačkih programa, potrebno je razviti što brži i pouzdaniji protokol za prekid dormantnosti; kako bi se mogao uzgojiti i ispitati što veći broj sjemenki nastalih križanjem, obzirom kako je svaka sjemenka potencijalni perspektivni genotip. U tu svrhu su Kachru i sur. (1972.) proveli fiziološko istraživanje sjemenki sorte 'Black Muscat' i najbolji postotci klijavosti, od 81.05 i 78.12% su dobiveni tretiranjem sjemenki giberelinskom kiselinom (GA3) u koncentracijama 0,2 i 0.1% tijekom 48 h prije 30-dnevnog perioda stratifikacije pri 5 – 7 °C. Treći je najbolji rezultat ostvaren u daleko najkraćem roku, a to je 72.11% klijavosti sjemenki izloženih neprestanom mlazu tekuće vode tijekom svega 12 dana, tijekom kojeg su sjemenke počele puštati korjenčiće, a prenošenjem u tlo su nastavile normalan rast. Velika je mana ovog istraživanja što nisu navedeni uvjeti u kojima su se sjemenke stavljale na naklijavanje (kao ni u većini prethodno navedenih), a ti su uvjeti također od presudne važnosti za uspješno kretanje sjemenki vinove loze. Ellis i sur. (1983.) su najveću klijavost (između 69 – 96%) postigli natapanjem sjemenki tijekom 24 h u 0,5 M H_2O_2, nakon čega je uslijedilo 24 h u 0,1% GA3 i potom hladna stratifikacija u trajanju 21 dan pri 3 – 5 °C, nakon čega su sjemenke naklijavali u dnevnom ciklusu temperature od 20 °C tijekom 16 h te 30 °C tijekom idućih 8 h. Postoje istraživanja optimalnih uvjeta stratifikacije i naklijavanja ostalih vrsta roda Vitis, poput Vitis vinifera subsp. sylvestris (Orrù i sur., 2012.), V. amurensis (Wang i sur., 2011.), ali i usporedbe između različitih vrsta i rodova porodice lozica (Vitaceae) (Orsenigo i sur., 2017.), koje se potencijalno mogu uzeti u obzir prilikom odabira idealne metode za prekid dormantnosti sjemena V. vinifere. Istraživanje Wang i sur. (2011.) dovelo ih je do zaključka kako sličnosti, ali i razlike u dormantnosti i zahtjevima prema uvjetima naklijavanja unutar vrste može biti posljedica različitih okolišnih uvjeta između mjesta njihova podrijetla i mjesta na koja su introducirane.

3. Materijali i metode

3.1. Lokacija i vrijeme istraživanja

Istraživanje je započeto u lipnju 2019., a trajalo je do rujna 2020. godine. Najveći dio istraživanja (vezan uz križanje, berbu, sjetvu križanaca i poljsku evaluaciju) provodio se na Vinogradarsko-vinarskom pokušalištu „Jazbina“ na adresi Jazbina 142 (Zagreb, Hrvatska). Dio vezan uz odvajanje sjemenki iz bobica nakon berbe grožđa provodio se u Ampelografskom laboratoriju Pokušališta, a dio vezan uz stratifikaciju i naklijavanje sjemenki dobivenih križanjem, provodio se u Laboratoriju za grožđe, mošt i vino Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo, na adresi Fakultetsko dobro 3 (Zagreb, Hrvatska). Geografske koordinate pokusnog nasada u kojem se provodilo križanje su E 461305 i N 5079696 (WGS84HTRS96/TM; https://geoportal.dgu.hr/), a plastenik u kojem su prvotno posijani dobiveni križanci, nalazi se u neposrednoj blizini nasada.

Vremenske prilike tijekom 2020. godine praćene su putem klimatološke postaje locirane na Pokušalištu, cca 150 m udaljenosti od pokusnog nasada i mjesta na kojem su rasli križanci, a analizirane su programom PinovaSoft v1.5.112.232. Pratila se samo srednja dnevna temperatura kako bi se prognozirali uvjeti za pojavu plamenjače vinove loze, jer je optimalna vlažnost osigurana navodnjavanjem sklopa u kojem su rasli križanci. Na grafikonu 3.1.1. prikazane su srednje 10-dnevne temperature tijekom perioda u kojem su križanci bili izloženi vanjskoj sredini, od 3. lipnja 2020. pa sve do provedbe evaluacije otpornosti 20. kolovoza 2020. konstantno su bili optimalni uvjeti za sekundarne infekcije plamenjače stvaranjem zoospora.



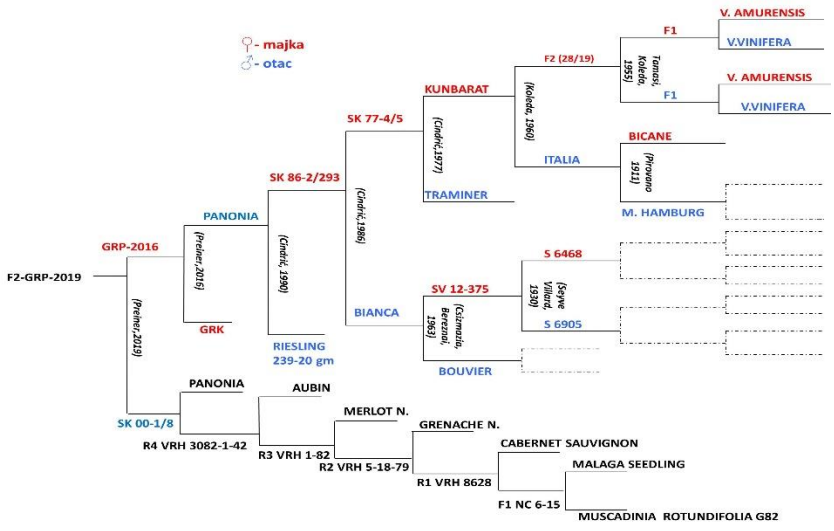
Grafikon 3.1.1. Prikaz srednjih 10-dnevnih temperatura tijekom rasta križanaca u modificiranim poljskim uvjetima

3.2. Biljni materijal

Iz populacije sjemenjaka nastalih 2015. godine križanjem sorata 'Grk' × 'Panonia' ('GRP') i 'Dišeća ranina' x 'Panonia' ('DRP') naziva AFZ-VV-15; izabrano je jedanaest genotipova kod kojih je genetičkom analizom utvrđeno prisustvo gena otpornosti na plamenjaču Rpv3 i Rpv12 i gena otpornosti na pepelnicu vinove loze Ren3 u heterozigotnom obliku (Hapač, 2020.). Genotipovi iz navedenog križanja: 'DRP-1', 'DRP-3', 'DRP-4', 'DRP-7', 'GRP-15', 'GRP-16', 'GRP-17', 'GRP-18', 'GRP-26', 'GRP-35' i 'GRP-36' odabrani su za ovo istraživanje jer je kod njih u poljskim uvjetima utvrđena visoka razina otpornosti na navedene bolesti (Grubišić, 2020.) kao i morfološki hermafroditan, a funkcionalno ženski tip cvijeta, što je olakšalo novu seriju križanja bez potrebe za emaskulacijom cvjetova majčinskih biljaka. Prema Grubišić (2020.), pokusni nasad u kojem rastu spomenuti sjemenjaci na vlastitom korijenu, posađen je 2017. godine s razmacima sadnje 2 m između i 1 m unutar redova, a trsovi su formirani u uzgojni oblik „lepeze“. Jedanaest navedenih genotipova korišteni su u ovom križanju kao majčinske biljke, a kao očinska biljka (oprašivač) korišten je polen otpornog genotipa 'SK 00-1/8' donesen u svježem stanju iz Sremskih Karlovaca (Novi Sad, Srbija) na dan križanja.

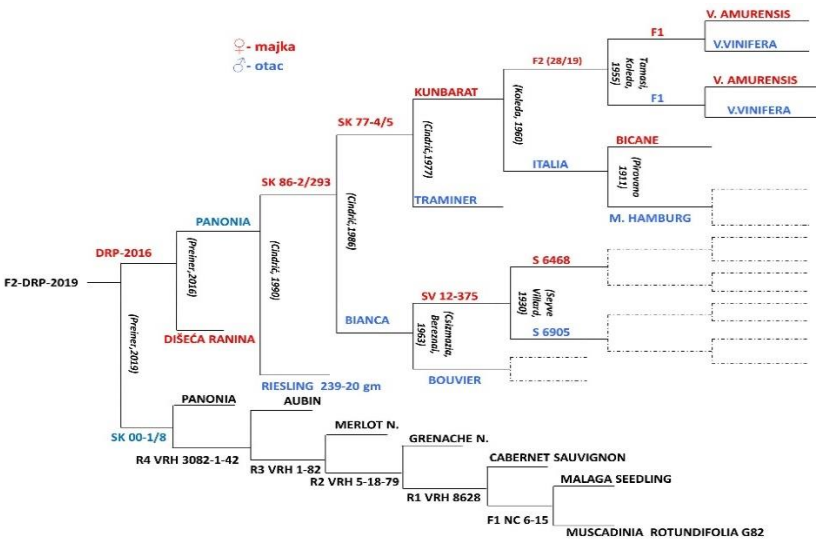
3.2.1. Genotip 'SK 00-1/8'

Nastao je križanjem roditeljskog para 'VRH 3082-1-42' × ‘Panonia’ (Ivanišević i sur., 2015.). Radi se o kompleksnom križancu s genetskom pozadinom iz različitih izvora, *M. rotundifolia*, *V. rupestris, V. berlandieri, V. labrusca, V. lincecumi* (Pauquet i sur., 2001.; Ivanišević i sur. 2015.). Za genotip 'SK 00-1/8', kao rezultat oplemenjivačkog programa Poljoprivrednog fakulteta Novi Sad, molekularnim je markerima utvrđena prisutnost dva gena za otpornost na pepelnicu, Run1 i Ren3 i jedan na plamenjaču vinove loze Rpv1 (Ivanišević i sur., 2015.). Na Slikama 3.2.1.1. i 3.2.1.2. uz Pedigree križanaca koji su sudjelovali u ovom istraživanju, vidljiv je i pedigree ove otporne sorte.



Slika 3.2.1.1. Pedigree križanaca 'GRP' x 'SK 00-1/8'

Izvor: M. Žulj Mihaljević, 2020.



Slika 3.2.1.2. Pedigree križanaca 'DRP' x 'SK 00-1/8'

Izvor: M. Žulj Mihaljević, 2020.

3.3. Postupak križanja

Priprema za križanje odabranih roditeljskih parova započela je 3. lipnja 2019. godine, neposredno prije početka cvatnje „majčinskih“ biljaka. Odabrano je i izolirano u bijele papirnate vrećice koliko je bilo moguće cvatova na svakom od jedanaest trsova korištenih u ovom istraživanju. Bijele su papirnate vrećice korištene za izolaciju cvatova od nenamjerne stranooplodnje putem vjetra ili insekata, kao i zaštitu od mogućih atmosferilija, a zbog njihovog materijala i boje, cvatovima se omogućio protok zraka i zadovoljavajuća insolacija. Slika 3.3.1. prikazuje izgled trsova po završetku izolacije cvatova.



Slika 3.3.1. Trsovi s izoliranim cvatovima

Oprašivanje je provedeno u dva navrata, 10. i 11. lipnja 2019. u prijepodnevnim satima polenom otporne sorte 'SK 00-1/8'. Zbog činjenice da se sjemenjaci i donor gena otpornosti poklapaju u vremenu cvatnje, cijeli cvatovi su brani sa trsova niti 24 h prije provedenog oprašivanja. Na taj način nije bilo potrebno sakupljati čisti polen ili ga na neki način duže skladištiti, što bi potencijalno utjecalo na smanjenje njegove vijabilnosti. Oprašivanje se provodilo „tresući cvat o cvat“ direktno iz vrećica u kojima su doneseni. Po završetku oprašivanja, vrećice na izoliranim cvatovima su ponovno zatvorene i označene pripadajućom šifrom oplemenjivačkog programa. Nakon navedenog, 26. lipnja 2019. su uklonjene papirnate vrećice sa oplođenih cvatova kako bi im se osiguralo što ujednačenije dozrijevanje. Trsovi su potom označeni etiketom koja je sadržavala šifru oplemenjivačkog programa i prekriveni zaštitnom mrežom kako bi se spriječio napad štetočina. Na Slikama 3.3.2. i 3.3.3. prikazan je provedeni postupak križanja.



Slika 3.3.2. Postupak oprašivanja cijelim cvatom (10.06.2020.)



Slika 3.3.3. Izolacija cvatova nakon oprašivanja

3.4. Berba i odvajanje sjemenki

Berba fiziološki zrelog grožđa sa hibridiziranih trsova odvila se 21. kolovoza 2019. godine u prijepodnevnim satima. Kratko po završetku berbe, uzorci su odneseni u Ampelografski laboratorij Pokušališta gdje su se odvajale sjemenke od ostalih dijelova ploda prvo ručno, a potom uz dodatak pektolitičkih enzima. Nakon uspješnog odvajanja, sjemenke su isprane pod mlazom vode te postavljene na celulozni papir u svrhu sušenja na zraku pri sobnoj temperaturi. Nakon spuštanja vlage u sjemenkama na potrebnu razinu, spremljene su u bijele papirnate vrećice do poduzimanja daljnjih koraka za prekid dormantnosti. Slika 3.4.1., prikazuje ostvareni prinos grožđa, a slike 3.4.2. i 3.4.3. postupke odvajanja i sušenja dobivenih sjemenki.



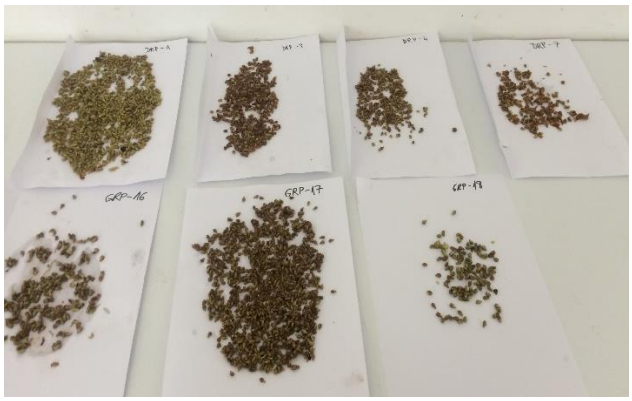
Slika 3.4.1. Prikupljanje grozdova u punoj zrelosti

Autor: Darko Preiner



Slika 3.4.2. Odvajanje sjemenki uz dodatak pektinaza

Autor: Darko Preiner



Slika 3.4.3. Sušenje sjemenki na zraku pri sobnoj temperaturi

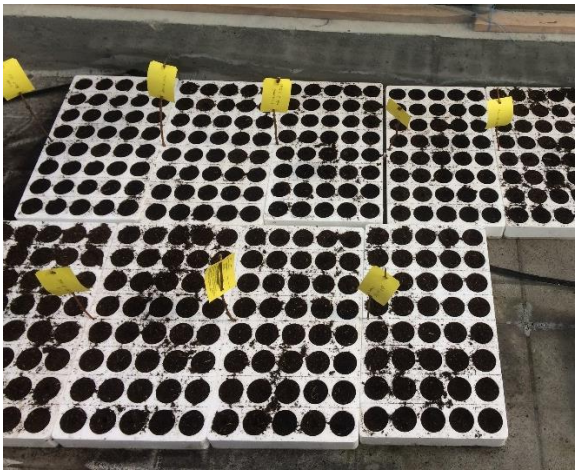
3.5. Stratifikacija

Stratifikacija je obavezan postupak u proizvodnji sjemena većine biljnih vrsta, a svrha joj je prekid primarne dormantnosti sjemena. 10. prosinca 2019. godine izvršena je površinska sterilizacija sjemenki 5-postotnom otopinom Izosan® G u trajanju od 15 minuta. Nakon ispiranja ostataka dezinficijensa sa površine sjemenki, iste su slagane u vodom natopljeni dravski pijesak u Sterivent posude S1686 proizvođača Duchefa Biochemie (https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/S1686/name/sterivent-high-container-107-x-94-x-96-mm). Naizmjenično je slagan sloj vlažnog pijeska i sjemenki svakih 1 cm visine posude, do vrha. Posude su pravilno označene, prekrivene aluminijskom folijom kako bi se spriječilo isušivanje pijeska (a omogućila izmjena plinova) te su pohranjene u frižider na 4 °C. Tijekom induciranog zimskog mirovanja u trajanju od 72 dana, povremeno se nadolijevala voda u posude kako bi se održala stalna vlažnost pijeska u kojem su boravile sjemenke.

3.6. Naklijavanje i sjetva križanaca

Sjemenke su 20. veljače 2020. izvađene iz pijeska, isprane vodom te sušene na sobnoj temperaturi u trajanju od desetak dana, prije njihovog skladištenja u papirnatim vrećicama do pojave povoljnih vremenskih uvjeta za njihovu sjetvu.

Dana 21. travnja 2020. godine, sjemenke su potopljene u vodu na period od 24 sata kako bi nabubrile. Dan poslije su posložene na navlaženi celulozni papir u petrijevke, zatvorene parafinom i stavljene u mračnu komoru na 26 °C na naklijavanje. 29. travnja posijane su prve isklijale sjemenke prethodno dezinficirane 5-postotnom otopinom Izosan® G u trajanju 15 minuta te 5-postotnom otopinom *Plant preservative mixture* (PPM) dezinficijensom biljnih tkiva, proizvođača Plant Cell Technology (https://www.plantcelltechnology.com/plant-preservative-mixture-ppm/) u trajanju četiri sata. Proklijale sjemenke sijane su u 34 posude od stiropora s 40 sadnih mjesta proizvođača Plastform d.o.o., dimenzija 53 x 31 x 6 cm s volumenom otvora od 78 ml (https://www.plastform.hr/presadnice-proizvodi.php). Posude su napunjene višenamjenskim supstratom Klasmann Substrat2 za sjetvu, proizvođača Klasmann-Deilmann (http://euro-brod.hr/ponuda/hortikultura/klasmann-deilmann-ponuda-proizvoda/gotovi-profesionalni-supstrati-proizvod1) i zalivene vodom do zasićenja. Sjemenke su posijane na dubinu 1 cm. Sjetva se odvijala u periodu od 29. travnja 2020. do 22. svibnja 2020. u zaštićenom prostoru (plasteniku Pokušališta), kada su sjemenjaci izneseni u poljske uvjete. Klijanje sjemenki je završilo 25. svibnja što znači da su one sjemenke koje su krenule sa rastom između 22. i 25. svibnja, direktno izložene vanjskoj sredini. Prilikom naklijavanja u komori, zbog visoke vlage i općenito povoljnih uvjeta za razvoj mikroorganizama, zabilježena je konstantna pojava *Botrytis sp., Penicillium sp., Aspergillus sp. i Rhizopus sp.*, zbog čega je u dodatna dva navrata provođena sterilizacija neproklijalih sjemenki. Slike 3.6.1. i 3.6.2. prikazuju porast sjemenjaka prvo u plasteniku te nakon iznošenja u poljske uvjete.



Slika 3.6.1. Početni rast sjemenjaka u plasteniku (29.04.2020.)



Slika 3.6.2. Sjemenjaci u modificiranim poljskim uvjetima (26.05.2020.)

3.7. Modificirani poljski uvjeti za evaluaciju otpornosti na plamenjaču

Sjemenjaci su iz plastenika izneseni u poljske uvjete 22. svibnja 2020. na povišeni stol dimenzija 6 x 2 m te su prepušteni prirodnoj zarazi plamenjačom. Radi osiguravanja povoljnih uvjeta za razvoj plamenjače, postavljen je sustav navodnjavanja kišenjem, koji je osiguravao povećanu vlažnost zraka i biljnih organa. Program navodnjavanja je postavljen dva puta po deset minuta dnevno, u 8 i 17 sati; a u sklop u kojem su rasli sjemenjaci pravilno je raspoređeno deset prskalica s protokom 2 L/h.

Dana 20. kolovoza 2020. godine provedena je vizualna evaluacija otpornosti sjemenjaka na plamenjaču vinove loze. Za utvrđivanje otpornosti korišten OIV deskriptor broj 452 (IPGRI 9.2.3) za stupanj otpornosti listova na *P. viticolu*, u pet razina od 1 do 9 (OIV, 2009.). Slika 3.7.1. prikazuje stupnjeve otpornosti, referentne sorte i upute za njihovo određivanje. Paralelno s provedbom evaluacije, najbolje ocijenjeni sjemenjaci (7-9) presađeni su u plastične tegle, a svi su ostali izbačeni iz daljnjeg postupka. Slika 3.7.2. prikazuje najbolje ocijenjene genotipove koji su presađeni u tegle na dan evaluacije.

Stupnjevi otpornosti:				
1	3	5	7	9
veoma nizak	nizak	srednji	visok	vrlo visok ili potpun
Referentne sorte:				
		5		9
		Millardet et Grasset 41 B		Kober 5 BB

Definicije:

1 = nije ograničeno, opsežne mrlje ili potpuno napadnute lisne plojke – jaka fruktifikacija gljivice - izražene i guste nekrotične točkice - vrlo rano otpadanje lišća

3 = opsežne, neograničene napadnute mrlje - vrlo jaka frutifikacija - brojne nekrotične točkice - otpadanje lišća (ne toliko rano kao kod prvog stupnja)

5 = ograničene napadnute mrlje promjera 1-2 cm - više ili manje ozbiljna fruktifikacija - nepravilno stvaranje nekrotičnih točkica

7 = manje napadnute mrlje - slabija fruktifikacija - malo nekrotičnih točkica

9 = točkasta pojava napada ili potpuno bez simptoma, bez fruktifikacije i nekrotičnih točkica

Slika 3.7.1. Upute za određivanje stupnja otpornosti listova vinove loze na napad *P. viticole*, OIV deskriptor 452, prevedeno po uzoru na originalni rad

Izvor: O.I.V. (2009). Descriptor list for grape varieties and Vitis species (2nd edition). International Organisation of Vine and Wine, Dedon, Paris



Slika 3.7.2. Izgled najbolje ocijenjenih sjemenjaka (7-9) nakon presađivanja u tegle

4. Rezultati i rasprava

4.1. Prinos i klijavost sjemena

U hibridizaciji je sudjelovalo jedanaest različitih kombinacija genotipova, a za svaki je roditeljski par zamijećena različita količina prinosa (dobivenog grožđa i sjemenki). Neki od mogućih razloga su: stupanj rodnosti, činjenica kako su u križanju korištene sorte s funkcionalno ženskim cvijetom, vrijeme i ispravnost provedbe izolacije cvatova, (ne)pravovremeno nanošenje polena i razina kompatibilnosti između roditelja. Dodatni je čimbenik relativno manje količine prinosa činjenica da su majčinske biljke iz ovog križanja na svoja stalna mjesta posađene 2017. godine te im je ovo bio tek drugi rod. Procijenjena je ukupna količina sjemenki prema masi svih uzoraka oko 5863. Najmanji je prinos imao genotip roditeljskog para 'GRP-26' x 'SK 00-1/8' sa svega 47 razvijenih sjemenki mase 1,64 g, a najveći 'GRP-17' x 'SK 00-1/8' s ukupnom masom sjemenki od 36,63 g tj. cca. 1434 sjemenki. Tablica 4.1.1. prikazuje ukupne mase sjemenki svih jedanaest genotipova, u kojoj je uočljiva velika razlika u prinosu te procijenjeni broj sjemenki dobiven računski na temelju mase 10 sjemenki.

Tablica 4.1.1. Rezultati križanja genotipova 'DRP' i 'GRP' sa genotipom 'SK-00-1/8'

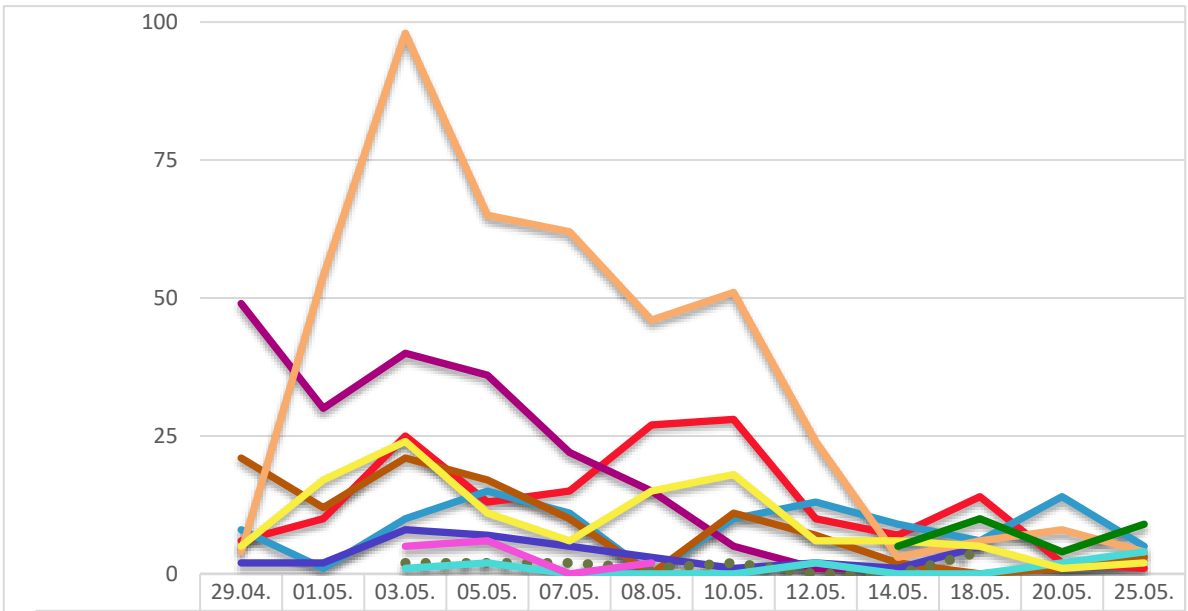
GENOTIP (x 'SK 00-1/8')	Masa 10 sjemenki (g)	Masa svih sjemenki (g)	Procijenjeni broj sjemenki	Broj proklijalih sjemenki	% proklijalih sjemenki
'DRP-1'	0,2443	22,77	932	158	17%
'DRP-3'	0,3331	18,52	556	102	18%
'DRP-4'	0,2517	12,74	506	199	39%
'DRP-7'	0,3644	8,37	230	105	46%
'GRP-15'	0,3266	13,75	421	36	9%
'GRP-16'	0,3706	8,69	234	13	6%
'GRP-17'	0,2555	36,63	1434	425	30%
'GRP-18'	0,4225	5,46	129	11	9%
'GRP-26'	47 ukupno	1,64	47	13	28%
'GRP-35'	0,2565	29,71	1158	116	10%
'GRP-36'	0,4045	8,73	216	28	13%
Ukupno	**3,2297**	**166,99**	**5863**	**1206**	**20%**

4.2. Dinamika klijanja

Sjemenke križanaca stavljene su nakon bubrenja na naklijavanje 22. travnja 2020., a klijale su u širokom vremenskom intervalu od 29. travnja do 25. svibnja. Ukupan broj sjemenki određen je računski na temelju mase uzorka od 10 sjemenki te ukupnoj masi svih sjemenki po genotipu. Na taj način utvrđeno je kako je križanjem dobiveno ukupno 5863 sjemenki. Tijekom navedenog perioda je isklijalo ukupno 1206 sjemenki, što označava prosječnu klijavost od 20%, jer se kretala u intervalu od 6% kod najmanje klijavog genotipa 'GRP-16' pa sve do 46% kod genotipa 'DRP-7'. Jedan od mogućih razloga za manji postotak klijavosti u usporedbi s onima iz literature je taj što su na naklijavanje postavljene sve sjemenke nastale hibridizacijom, uključujući i one koje su isplutale na površinu posude tijekom flotacijskog testa. Ostali autori

za plutajuće sjemenke navode kako nisu klijave i preporučaju ih izbaciti iz daljnjih postupaka (Reisch, 2001.; Eibach i Töpfer, 2015.), no u našem se istraživanju pokazalo kako su pojedine takve sjemenke ipak proklijale, iako se ne može procijeniti jesu li se razvile u potpunu biljku.

Jedini parametar u kojem su svi genotipovi ujednačeni je pauza u početku klijanja od 22. do 29. travnja, no na grafikonu 4.2.1. vidljivo je kako su sjemenke različitih genotipova klijale različitom ujednačenosti i u različitim intervalima. Sjemenke genotipa 'DRP-1' počele su klijati 29. travnja i ravnomjerno su raspoređene tijekom cijelog perioda do kraja svibnja, s najvećim brojem proklijalih sjemenki u periodu od 8. do 10. svibnja, nakon čega su brojke počele padati. Ukupan je broj proklijalih sjemenki ovog genotipa 158. Sjemenke genotipa 'DRP-3' također su s klijanjem započele 29. travnja i završile 25. svibnja, no s pauzom u periodu od 7. do 10. svibnja kada nije pronađena nijedna proklijala sjemenka. Ukupan je broj proklijalih sjemenki ovog genotipa 102. Sjemenke genotipa 'DRP-4' imale su u usporedbi sa svim drugim genotipovima najranije najveću klijavost (drugi tjedan od početka naklijavanja, 29. travanj – 5. svibanj), kada im je brojka značajno počela padati. Posljednja sjemenka ovog genotipa je proklijala 14. svibnja, a ukupan je broj proklijalih sjemenki 199.



	29.04.	01.05.	03.05.	05.05.	07.05.	08.05.	10.05.	12.05.	14.05.	18.05.	20.05.	25.05.
DRP-1	6	10	25	13	15	27	28	10	7	14	2	1
DRP-3	8	1	10	15	11	0	10	13	9	6	14	5
DRP-4	49	30	40	36	22	15	5	1	1			
DRP-7	21	12	21	17	10	0	11	7	2	0	1	3
GRP-15	2	2	8	7	5	3	1	2	1	5		
GRP-16			2	2	2	1	2	0	0	4		
GRP-17	4	54	98	65	62	46	51	24	3	6	8	4
GRP-18			1	2	0	0	0	2	0	0	2	4
GRP-26			5	6	0	2						
GRP-35	5	17	24	11	6	15	18	6	6	5	1	2
GRP-36									5	10	4	9

Grafikon 4.2.1. Dinamika klijanja križanaca u periodu 29.04. – 25.05.2020.

Sjemenke genotipa 'DRP-7' klijale su također kroz cijeli promatrani period, a može ih se usporediti s genotipom 'DRP-3' zbog pauze u klijanju od 7. do 10. svibnja, s time da je kod njih uočena i druga pauza u periodu 14. – 20. svibnja. Ukupan je broj proklijalih sjemenki ovog genotipa 105, a neovisno o dvije „pauze“ koje su imale u klijanju, ovaj je genotip imao najveći postotak klijavosti od 46%. Sjemenke genotipa 'GRP-15' odlikuje mala, ali ravnomjerno raspoređena klijavost. Klijanje je ovog genotipa trajalo od 29. travnja do 18. svibnja, a najveći je broj isklijalih u periodu od 3. do 7. svibnja, odnosno 11. – 13. dan od početka naklijavanja. U promatranom periodu proklijalo je ukupno 36 sjemenki ovog genotipa. Sjemenke genotipa 'GRP-16' prvi su uzorak koji nije počeo klijati prije 3. svibnja, dakle 11. dan od stavljanja na naklijavanje. Ovaj genotip također karakterizira najmanja klijavost sjemenki gdje je u periodu od 3. do 18. svibnja sa rastom krenulo samo 13 komada, odnosno 6%.

Genotip 'GRP-17' je u berbi bio daleko najveći uzorak s najvećim prinosom grožđa, a posljedično i sjemenki i njegovo je klijanje trajalo u cijelom promatranom periodu od 29. travnja do 25. svibnja. 3. svibnja izbrojeno je čak 98 sjemenki ovog genotipa, što je najveći broj proklijalih sjemenki u jednom danu. Ukupan broj proklijalih sjemenki ovog genotipa je 425, dvostruko više od bilo kojeg drugog genotipa, iako nisu imale najveći postotak klijavosti (30%). Sjemenke genotipa 'GRP-18' s klijanjem su počele 3. svibnja, imale su dvije dugačke pauze: 5. – 12. svibnja i 13. – 20., a iako je ovaj genotip rezultirao s najmanjim brojem proklijalih sjemenki (11), njegov postotak klijavosti (9%) nije bio najmanji. Brojčano najmanji početni uzorak s ukupno 47 sjemenki, genotip 'GRP-26' je također imao i najkraći period klijavosti; samo od 3. do 8. svibnja, odnosno 11. – 16. dan od početka naklijavanja. U navedenom periodu proklijalo je ukupno 13 sjemenki. Sjemenke drugog najvećeg uzorka 'GRP-35', ravnomjerno su klijale tijekom cijelog promatranog perioda, s najvećom brojkom od 24 sjemenki proklijalih u istom danu zabilježenih 3. svibnja, a ukupan je broj proklijalih 116. Sjemenke posljednjeg križanog genotipa 'GRP-36', uvjerljivo su najkasnije krenule sa klijanjem, tek 14. svibnja, odnosno 22 dana nakon stavljanja u mračnu komoru na naklijavanje, a u periodu do 25. svibnja, ukupno je proklijalo 28 sjemenki, odnosno 13%.

Neovisno o dobivenom manjem postotku klijavosti sjemenki od prosječno 20%, nego što je to zabilježeno u literaturi (od 40 do >90% prema Singh (1961.) iz Ellis i sur. (1983.), Kachru i sur. 1972.; Ellis i sur. 1983.; Thaipong i sur. 2007.; s time da treba uzeti u obzir kako su provodili ili duži period stratifikacije ili kombinirali kraću hladnu stratifikaciju s pred-tretiranjem sjemenki različitim kemijskim sredstvima); naši rezultati potvrđuju kako je odabrana metoda stratifikacije uspješno provedena jer su sjemenke svih genotipova krenule sa rastom. Rives (1965.) iz Eibach i Töpfer (2015.) navodi kako je uobičajena praksa stratifikacije sjemenki vinove loze držanje na 2 – 4 °C tijekom 75 dana, što odgovara našim rezultatima. Peterlunger i sur. (2003.) navode kako su za potrebe vlastitog oplemenjivačkog programa također držali vlažne sjemenke na 4 °C, no tijekom kraćeg perioda od 60 dana, a umjesto pijeska korišten je supstrat od mješavine perlita i treseta u omjeru 1:1. Iako navode kako je navedeni postupak uspješno prekinuo period dormantnosti, nisu objavljivali rezultate klijavosti hibridiziranih sjemenki, stoga isto nije moguće usporediti. Usprkos uvriježenom mišljenju (što su svojim istraživanjem potvrdili i Wang i sur., 2011. na *V. amurensisu*) kako za

pospješivanje klijavosti sjemenki vinove loze nije potrebna svijetlost; pojedina istraživanja potvrđuju kako su bolji rezultati klijavosti ostvareni u slučaju izmjene 12-satnog fotoperioda u 24-satnom ciklusu, u usporedbi sa stalnim držanjem u mraku (Orrù i sur., 2012.; Orsenigo i sur., 2017.). Poznato je kako vinova loza i njezin divlji predak subsp. *sylvestris* imaju najveću klijavost pri temperaturama iznad 25 °C, no istraživanja Ellisa i sur. (1983.), Wanga i sur. (2011.) i Orseniga i sur. (2017.) pokazuju kako su sjemenke imale veći postotak klijavosti, u usporedbi s konstantnom temperaturom, prilikom izmjene različitih temperatura tijekom naklijavanja. Prvi su sjemenke držali tijekom 16 sati na 20 °C, a potom 8 sati na 30 °C, a drugi su radili izmjenu svakih 12 sati. Posljednji bi se postupak mogao razmotriti u budućim fazama oplemenjivačkog programa ili bi se trebao razmotriti razvoj novog, optimalnog protokola koji će vrijediti za hrvatske autohtone sorte u neovisnom istraživanju, kako bi se spriječio gubitak dragocjenog biljnog materijala tijekom narednih generacija križanja. Pojedini autori sugeriraju kako bi primjena GA_3 mogla u potpunosti zamijeniti provođenje hladne stratifikacije sjemenki vinove loze (Orsenigo i sur., 2017.), no pregledom literature i rezultatima vlastitog istraživanja, Ellis i sur. (1983.) navode kako bi takav tretman mogao rezultirati abnormalnim rastom biljaka koje se nisu u mogućnosti potpuno razviti ili čak smrću određenog djela sjemenki, što je u ovoj fazi programa previše riskantno i utječe na uspješnost rezultata križanja.

4.3. Vizualna evaluacija otpornosti na plamenjaču

Vizualna je evaluacija provedena jednom tijekom vegetacije 2020. godine. Iako većina oplemenjivača za utvrđivanje otpornosti listova na plamenjaču koristi metodu lisnih diskova, koja se ujedno smatra pouzdanijom i praktičnijom (Brown i sur., 1999.; Eibach i sur, 2007.; Yu i sur., 2012.; Saifert i sur., 2018.; Chitarrini i sur., 2020; Possamai i sur., 2020.) u našem slučaju isto nije bilo moguće provesti zbog nedovoljnog razvoja listova mladih biljčica. Mali porast križanaca od sjetve, zbog stresnih uvjeta u kojima su rasli (visoka vlaga, velika izloženost suncu, visok pritisak bolesti) je također razlog provođenja jednokratne evaluacije. Tijekom ove faze programa uobičajena je praksa napraviti umjetnu inokulaciju plamenjačom kako bi se osigurala zaraza (Eibach i Töpfer, 2015.), no u našem istraživanju, modificirali smo kišenjem uvjete za pojavu plamenjače koja je široko prisutna na lokalitetu. Gessler i sur. (2011.) navode kako se još uvijek većina modela za prognozu i simulaciju zaraze plamenjačom oslanja na Blaeserove parametre (prema Blaeser i Weltzien, 1978.) koji uključuju 98% relativne vlage zraka, 4 h mraka i optimalnu temperaturu od 19 °C (a minimalnu od 13 °C), što potvrđuje kako su u cijelom promatranom periodu (od iznošenja sjemenjaka iz plastenika) bili povoljni uvjeti za razvoj sekundarnih infekcija plamenjače.

Tablica 4.3.1. prikazuje rezultate evaluacije sjemenjaka po genotipu u 5 razina pomoću OIV deskriptora 452 (OIV, 2009.).

Tablica 4.3.1. Rezultati evaluacije po genotipu u 5 razina pomoću OIV deskriptora 452

Genotip/ocjena	*1**	*3*	*5*	*7*	*9*	*Ukupno živih biljaka*
'DRP-1'	55	35	27	6	1	124
'DRP-3'	40	21	8	5	0	74
'DRP-4'	86	50	9	8	1	154
'DRP-7'	33	28	15	4	1	81
'GRP-15'	11	10	7	4	0	32
'GRP-16'	5	3	1	0	0	9
'GRP-17'	235	102	24	17	1	379
'GRP-18'	6	2	2	0	0	10
'GRP-26'	6	2	1	0	0	9
'GRP-35'	41	25	7	5	0	78
'GRP-36'	6	5	0	1	0	12
***UKUPNO**:*	**524**	**283**	**101**	**50**	**4**	**962**

**1 – potpuno osjetljivi genotip, 9 – potpuno otporan genotip*

Od ukupno posijanih 1206 biljaka, 20. kolovoza 2020., kada je vršena evaluacija otpornosti na plamenjaču, zatečeno je ukupno 962 „žive“ biljke. Razlika od 244 biljaka između broja posijanih i broja pronađenih živih biljaka su sadna mjesta označena ocjenom „0“ što označava u nekim slučajevima prazno mjesto u stiroporu, a u drugim nepostojanje biljke; za koje je teško je razlučiti jesu li uopće izašle iz zemlje nakon klijanja ili su u potpunosti uništene plamenjačom, zbog čega isto nije prikazano. Kao što je vidljivo u Tablici 4.3.1., od navedenih 962 razvijenih sjemenjaka, 50 ocijenjeno kao „visoko otporno“ na napad plamenjače (ocjenom 7), a četiri su križanca ocijenjeni najvišom ocjenom (9) koja označava vrlo visoku, odnosno potpunu otpornost na napad plamenjače i za koje se pretpostavlja da su naslijedili sve gene otpornosti prisutne u roditeljskom paru. Slike 4.3.1. – 4.3.5. prikazuju izgled biljaka obzirom na ostvarenu ocjenu u evaluaciji.



Slika 4.3.1. Izgled biljke ocijenjene ocjenom 1



Slika 4.3.2. Izgled biljke ocijenjene ocjenom 3



Slika 4.3.3. Izgled biljke ocijenjene ocjenom 5

Na Slikama 4.3.1. – 4.3.3. prikazani su križanci ocijenjeni ocjenama 1 – 5, koje označavaju veoma nisku do srednju otpornost prema napadu plamenjače. Prve dvije ocjene

dodjeljivane su onim križancima s izrazito malim porastom, na kojima su prisutne jake nekroze svih biljnih dijelova i otpadanje prvih listova s koljenaca najbližih tlu. Križanci ocijenjeni ocjenom 5, imali su nešto veći porast i razvoj većeg broja neoštećenih listova na kojima su prisutne manje nekrotične točkice zbog prisustva HR-a.



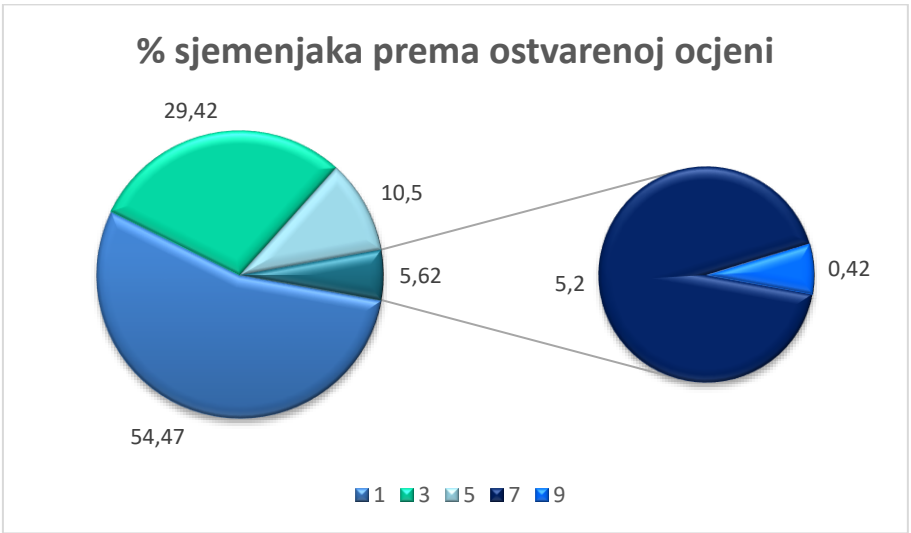
Slika 4.3.4. Izgled biljke ocijenjene ocjenom 7 (visoka otpornost)



Slika 4.3.5. Izgled biljke ocijenjene najvišom ocjenom 9 (potpuna otpornost)

Na slikama 4.3.4. i 4.3.5. vidljiv je viši habitus sjemenaka s visokom i potpunom otpornosti na plamenjaču vinove loze. Njihovi listovi nisu prikazivali nikakve vidljive simptome napada ili sporulacije plamenjače te su se potpuno razvili, bez otpadanja.

Nakon provedene evaluacije, ukupno 54 sjemenjaka (5,62%) su postigli zadovoljavajući rezultat za nastavak oplemenjivačkog programa, a postotni udjeli svih ostvarenih ocjena gledano na 962 žive biljke su prikazani na Grafikonu 4.3.1.



Grafikon 4.3.1. postotci ostvarenih ocjena prilikom evaluacije (1 – potpuno osjetljivi genotip, 9 – potpuno otporan genotip)

Eibach i Töpfer (2015.) navode kako otprilike 20% sjemenjaka prolazi ovu prvu fazu evaluacije otpornosti na plamenjaču, što je 4x više nego u našem slučaju. Neki od mogućih razloga su kompatibilnost roditelja, korištenje tzv. „superdonora“ (koji imaju gen-lokuse otpornosti u homozigotnom stanju i koji će sigurno prenijeti željene gene u potomstvo). U našem je istraživanju potomstvo prvog koraka križanja naslijedilo sve gene otpornosti u heterozigotnom stanju (Hapač, 2020.), a za genotip 'SK 00-1/8' nemamo informaciju o stanju gen-lokusa otpornosti. Dodatno, moguće je kako je manji postotak visokootpornih sjemenjaka rezultat stresnih uvjeta kojima su izloženi, jer nisu rađena tretiranja niti na ostale biljne bolesti koje su mogle uzrokovati dodatne zaraze i/ili povećanu osjetljivost sjemenjaka u toliko ranoj fazi razvoja prema plamenjači. Također, prema Ivanišević i sur. (2015.) vidljivo je kako je jedan od roditelja genotipa 'SK 00-1/8' otporna sorta 'Panonia', koja je također korištena u prvom koraku križanja ovog oplemenjivačkog programa. To bi značilo kako su 'GRP' i 'DRP' genotipovi, kao i 'SK 00-1/8' tzv. „polubraća“ te da sjemenjaci provedenog koraka križanja ('GRP' x 'SK 00-1/8' i 'DRP' x 'SK 00-1/8') nose 50% gena iz otporne sorte 'Panonije' čime ne možemo u potpunosti odbaciti pojavu određenog stupnja inbreeding depresije.

U svakom slučaju, dobiven je zadovoljavajući broj genotipova sa visokom fenotipskom otpornošću prema plamenjači vinove loze koji će biti korišteni u daljnjim fazama ovog programa, a rezultati genetičkih analiza će pokazati stvarnu uspješnost provedene hibridizacije i dati smjernice za iduće korake.

5. Zaključak

Oplemenjivački se program Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu provodi od 2015. godine sa svrhom stvaranja novih kvalitetnih vinskih sorata vinove loze prilagođenih za rast u hrvatskim agroekološkim uvjetima.

Prvi je korak križanja već rezultirao uspješnim prijenosom tri lokusa otpornosti prema plamenjači (Rpv3 i Rpv12) i pepelnici vinove loze (Ren3) iz sorte 'Panonia' u potomstvo križanja s hrvatskim autohtonim sortama s funkcionalno ženskim cvijetom ('Grk' i 'Dišeća ranina'), koje je pokazivalo visoke razine otpornosti na njihov napad u poljskim uvjetima bez tretiranja sredstvima za zaštitu bilja.

U drugom koraku križanja, koji je predmet ovog istraživanja, provedena je hibridizacija 11 genotipova iz navedenog potomstva sa genotipom 'SK 00-1/8' koji posjeduje dva gen-lokusa otpornosti na pepelnicu (Run1 i Ren3) i jedan na plamenjaču (Rpv1) s ciljem uspješne provedbe križanja i piramidizacije većeg broja gena te selekcije sjemenjaka izlaganjem pritisku bolesti u modificiranim poljskim uvjetima.

Križanje je uspješno provedeno te je dobiven zadovoljavajući broj sjemenki tj. ukupno više od 5800 sjemenki.

Nakon provedene stratifikacije postignuta je različita klijavost sjemenjaka ovisno o roditeljskom paru, između 6% i 46% tj. prosječno 20%, nakon čije su sjetve dobivene ukupno 962 biljke.

Vizualnom su evaluacijom pomoću OIV deskriptora 452 za procjenu razine otpornosti na plamenjaču vinove loze, izdvojena 54 genotipa iz predmetnih kombinacija križanja s visokom i vrlo visokom otpornošću prema plamenjači vinove loze.

Navedenih 54 genotipova će u 2021. godini biti analizirani korištenjem genetskih markera s ciljem utvrđivanja posjedovanja gena otpornosti, a spomenuti rezultati analize će dati smjernice za određivanje budućih koraka ovog oplemenjivačkog programa.

6. Popis literature

1. Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A.-F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R., Di Gaspero, G., (2009). Resistance to Plasmopara viticola in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. Theor Appl Genet 120, 163–176. https://doi.org/10.1007/s00122-009-1167-2
2. Ben-Ari, G., Lavi, U., (2012). Marker-assisted selection in plant breeding, in: Plant Biotechnology and Agriculture. Elsevier, 163–184. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00011-0
3. Blaeser, M. i Weltzien, H.C. (1978). Die Bedeutung von Sporangienbildung, -ausbreitung und -keimung für die Epidemiebildung von *Plasmopara viticola*. *Zeitschrift* für *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 85, 155–161.
4. Brown, M. V., Moore, J. N., Fenn, P., McNew, R. W. (1999). Comparison of leaf disk, greenhouse, and field screening procedures for evaluation of grape seedlings for downy mildew resistance. HortScience, 34(2), 331-333.
5. Beljo (2012.). Tehnike oplemenjivanja bilja-skripta. Sveučilište u Zadru.
6. Bewley, J.D., (1997). Seed Germination and Dormancy. Plant Cell 1055–1066. https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055
7. Boso, S., Alonso-Villaverde, V., Gago, P., Santiago, J.L., Martínez, M.C., (2014). Susceptibility to downy mildew (Plasmopara viticola) of different Vitis varieties. Crop Protection 63, 26–35. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.018
8. Bradbeer, J.W. (1988). The Breaking of Seed Dormancy. In: Seed Dormancy and Germination. Tertiary Level Biology. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7747-4_6
9. Buonassisi, D., Colombo, M., Migliaro, D., Dolzani, C., Peressotti, E., Mizzotti, C., i Vezzulli, S. (2017). Breeding for grapevine downy mildew resistance: a review of "omics" approaches. Euphytica, 213(5). doi:10.1007/s10681-017-1882-8
10. Chitarrini, G., Riccadonna, S., Zulini, L., Vecchione, A., Stefanini, M., Larger, S., Pindo, M., Cestaro, A., Franceschi, P., Magris, G., Foria, S., Morgante, M., Di Gaspero, G., Vrhovsek, U., (2020). Two-omics data revealed commonalities and differences between Rpv12- and Rpv3-mediated resistance in grapevine. Sci Rep 10, 12193. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69051-6
11. Cindrić, P. (1981). Oplemenjivanje vinove loze. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
12. Coito, J.L., Silva, H.G., Ramos, M., Cunha, J., Eiras-Dias, J., Amâncio, S., Costa, M., i Rocheta, M. (2019). Vitis flower types: from the wild to crop plants. PeerJ, 7, e7879. https://doi.org/10.7717/peerj.7879
13. Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K., (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142, 169–196. https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5
14. Čmelik, Z., Perica, S. (2007). Dormantnost sjemena voćaka. Sjemenarstvo. 24(1): 51-58. Dostupno na poveznici https://hrcak.srce.hr/file/26244 pristup 27.12.2020.
15. Dangl, J.L., Horvath, D.M., Staskawicz, B.J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. Science; 341: 746–751.
16. Delbac, L., Delière, L., Schneider, C., & Delmotte, F. (2019). Evidence for sexual reproduction and fertile oospore production by Plasmopara viticola on the leaves of partially resistant grapevine cultivars. Acta Horticulturae, (1248), 607–620. doi:10.17660/actahortic.2019.1248.82
17. Delmas, C.E., Dussert, Y., Delière, L., Couture, C., Mazet, I.D., Richart Cervera, S., Delmotte, F. (2017). Soft selective sweeps in fungicide resistance evolution: recurrent mutations without fitness costs in grapevine downy mildew. Mol Ecol.; 26(7):1936-1951. doi: 10.1111/mec.14006. Epub 2017 Jan 27. PMID: 28063192.
18. Delmas, C.E., Fabre, F., Jolivet, J., Mazet, I.D., Richart Cervera, S., Delière, L., Delmotte, F. (2016). Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. Evolutionary Applications, 9(5), 709–725. doi:10.1111/eva.12368
19. Delrot, S., Grimplet, J., Carbonell-Bejerano, P., Schwandner, A. i sur. (2020). Genetic and Genomic Approaches for Adaptation of Grapevine to Climate Change. In: Kole C. (eds) Genomic Designing of

Climate-Smart Fruit Crops. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97946-5_7 Springer, Cham Online ISBN 978-3-319-97946-5 dostupno i na poveznici https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-97946-5_7 pristup 21.12.2020.
20. Divilov, K., Barba, P., Cadle-Davidson, L., Reisch, B.I., (2018). Single and multiple phenotype QTL analyses of downy mildew resistance in interspecific grapevines. Theor Appl Genet 131, 1133–1143. https://doi.org/10.1007/s00122-018-3065-y
21. Dussert, Y., Mazet, I.D., Couture, C., Gouzy, J., Piron, M.C., Kuchly, C., Bouchez, O., Rispe, C., Mestre, P. i Delmotte, F. (2019). 'A High-Quality Grapevine Downy Mildew Genome Assembly Reveals Rapidly Evolving and Lineage-Specific Putative Host Adaptation Genes', Genome Biology and Evolution. Edited by H. Watanabe, 11(3), 954–969. doi: 10.1093/gbe/evz048.
22. Eibach, R., Töpfer, R., (2014). Progress in Grapevine Breeding. Proc. Xth Intl. Conf. on Grapevine Breeding and Genetics. Eds.: B.I. Reisch and J. Londo. Acta Hort. 1046, ISHS 2014, 197-209. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1046.25
23. Eibach, R., Töpfer, R. (2015). Traditional grapevine breeding techniques. In: Reynolds A. (eds) Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry. Cambridge: Elsevier, https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-075-0.00007-7
24. Eisenmann, B., Czemmel, S., Ziegler, T., Buchholz, G., Kortekamp, A., Trapp, O., Rausch, T., Dry, I., Bogs, J. (2019). Rpv3–1 mediated resistance to grapevine downy mildew is associated with specific host transcriptional responses and the accumulation of stilbenes. BMC Plant Biol 19, 343 https://doi.org/10.1186/s12870-019-1935-3
25. Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H., (1983). A note on the development of a practical procedure for promoting the germination of dormant seed of grape (*Vitis* spp.). Vitis 22, 211–219.
26. Feechan, A., Anderson, C., Torregrosa, L., Jermakow, A., Mestre, P., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Walker, A.R., Cadle-Davidson, L., Reisch, B., Aubourg, S., Bentahar, N., Shrestha, B., Bouquet, A., Adam-Blondon, A.F., Thomas, M.R., Dry, I.B. (2013). Genetic dissection of a TIR-NBLRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. Plant J 76:661–674
27. Fischer, B.M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K.J., Töpfer, R., Zyprian, E.M., (2004). Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. Theor Appl Genet 108, 501–515. https://doi.org/10.1007/s00122-003-1445-3
28. Fröbel, S. i Zyprian, E. (2019). 'Colonization of Different Grapevine Tissues by Plasmopara viticola—A Histological Study', Frontiers in Plant Science, 10, p. 951. doi: 10.3389/fpls.2019.00951.
29. Fu, P., Wu, W., Lai, G., Li, R., Peng, Y., Yang, B., Lu, J. i sur. (2020). Identifying Plasmopara viticola resistance Loci in grapevine (Vitis amurensis) via genotyping-by-sequencing-based QTL mapping. Plant Physiology and Biochemistry. doi:10.1016/j.plaphy.2020.05.016
30. Gessler, C., Pertot, I., Perazzolli, M. (2011). Plasmopara viticola: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. Phytopathol. Mediterr. 50, 3–44. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360
31. Grubišić, A. (2020). 'Otpornost sjemenjaka nastalih križanjem sorata vinove loze 'Grk' i 'Panonia' na plamenjaču vinove loze', Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, citirano: 04.01.2021., https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:804082
32. Grubišić, V., Preiner, D. (2020). 'Prikaz oplemenjivačkih programa na vinovoj lozi (Vitis vinifera L.) u Europi', Glasnik Zaštite Bilja, 43(6), 122-137. https://doi.org/10.31727/gzb.43.6.13
33. Guimier, S., Delmotte, F., Miclot, A.S., Fabre, F., Mazet, I., Couture, C., Schneider, C., Delière, L., (2019). OSCAR, a national observatory to support the durable deployment of disease-resistant grapevine cultivars. Acta Hortic. 21–34. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1248.4
34. Hapač, K. (2020). 'Primjena molekularnih markera u detekciji gena za otpornost na plamenjaču i pepelnicu vinove loze', Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, citirano: 04.01.2021., https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:740302
35. Ivanišević, D., Korać, N., Čabilovski, R., Majnolović, M., Paprić, Đ., Kuljančić, I., Medić, M. (2012). Wine grape cultivars suitable for organic production. In International Symposium for Agriculture and Food,

XXXVII Faculty-Economy Meeting, IV Macedonian Symposium for Viticulture and Wine Production, VII Symposium for Vegetables and Flower Production, Skopje, Macedonia, 12-14 December 2012 (pp. 171-181). Faculty of Agricultural Sciences and Food, University" Ss Cyril and Methodius".
36. Joshi, R., Nayak, S. (2010). Gene pyramiding—a broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. Biotechnol Mol Biol Rev 5:51–60
37. Kachru, R.B., Singh, R.N., Yadav, I.S., (1972). Physiological studies on dormancy in grape seeds (*Vitis vinifera* var. Black Muscat). Vitis 11, 289–295.
38. Kamoun, S**.** et al*.* (2015). 'The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology: Top 10 oomycete plant pathogens', *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 413–434. doi: 10.1111/mpp.12190.
39. Maletić, E., Kontić, J., Ilijaš, I. (Eds.), (2015). Zelena knjiga: hrvatske izvorne sorte vinove loze = Green book; indigenous grapevine varieties of Croatia. Ministarstvo zaštite okoliša i prirode, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb. Dostupno na poveznici http://www.agr.unizg.hr/multimedia/ebooks/zelena-knjiga-vinove-loze.pdf
40. Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2008). Vinova loza: ampelografija, ekologija i oplemenjivanje. Školska knjiga, Zagreb.
41. Maletić, E., Pejić, I., Kontić, J.K., Zdunić, G., Preiner, D., Šimon, S., Andabaka, Ž., Žulj Mihaljević, M., Bubola, M., Marković, Z., Stupić, D., Mucalo, A., (2015). Ampelographic and genetic characterization of Croatian grapevine varieties. Vitis 54 (Special Issue), 93–98.
42. Maul i sur. (2021.): Vitis International Variety Catalogue - www.vivc.de – (pristup 28.12.2020.)
43. O.I.V. (2009). Descriptor list for grape varieties and Vitis species (2nd edition). International Organisation of Vine and Wine, Dedon, Paris
44. Orrù, M., Mattana, E., Pritchard, H.W., Bacchetta, G., (2012). Thermal thresholds as predictors of seed dormancy release and germination timing: altitude-related risks from climate warming for the wild grapevine Vitis vinifera subsp. sylvestris. Annals of Botany 110, 1651–1660. https://doi.org/10.1093/aob/mcs218
45. Orsenigo, S., Ardenghi, N.M.G., Vagge, I., Cauzzi, P, Müller, J.V., Mondoni, A. (2017). Comparative seed germination study across alien grapes (Vitis, Vitaceae) in Europe. Weed Research. 57, 372–381. https://doi.org/10.1111/wre.12268
46. Palumbo, F., Vannozzi, A., Magon, G., Lucchin, M., Barcaccia, G., (2019). Genomics of Flower Identity in Grapevine (Vitis vinifera L.). Front. Plant Sci. 10, 316. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00316
47. Pauquet, J., Bouquet, A., This, P., Adam-Blondon, A.F. (2001). Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. Theor Appl Genet 103:1201–1210.
48. Pedneault, K., Provost, C., (2016). Fungus resistant grape varieties as a suitable alternative for organic wine production: Benefits, limits, and challenges. Scientia Horticulturae 208, 57–77. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.016
49. Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D., Di Gaspero, G., Testolin, R., Merdinoglu, D. i Mestre, P. (2010). 'Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety', BMC Plant Biology, 10(147), doi:10.1186/1471-2229-10-147. https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-10-147 pristup 22.12.2020.
50. Pertot, I., Caffi, T., Rossi, V., Mugnai, L., Hoffmann, C., Grando, M.S., Gary, C., Lafond, D., Duso, C., Thiery, D., Mazzoni, V., Anfora, G., (2017). A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. Crop Protection 97, 70–84. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.025
51. Peterlunger, E., Di Gaspero, G., Cipriani, G., Sivilotti, P., Zulini, L., Marrazzo, M.T., Andreetta, D., Testolin, R., (2003). BREEDING STRATEGY FOR THE INTROGRESSION OF DISEASE RESISTANCE GENES INTO EUROPEAN GRAPEVINE. Acta Hortic. 665–670. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.603.91
52. Possamai, T., Migliaro, D., Gardiman, M., Velasco, R., De Nardi, B., (2020). Rpv Mediated Defense Responses in Grapevine Offspring Resistant to Plasmopara viticola. Plants 9, 781. https://doi.org/10.3390/plants9060781

53. Qiu, W., Feechan, A., Dry, I., (2015). Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (Erysiphe necator), the causal agent of powdery mildew disease. Hortic Res 2, 15020. https://doi.org/10.1038/hortres.2015.20
54. Saifert, L., Sánchez-Mora, F.D., Assumpção, W.T., Zanghelini, J.A., Giacometti, R., Novak, E.I., Vesco, L.L.D., Nodari, R.O., Eibach, R., Welter, L.J., (2018). Marker-assisted pyramiding of resistance loci to grape downy mildew. Pesq. agropec. bras. 53, 602–610. https://doi.org/10.1590/s0100-204x2018000500009
55. Sánchez-Mora, F.D., Saifert, L., Zanghelini, J., Assumpção, W.T., Guginski-Piva, C.A., Giacometti, R., Novak, E.I., Klabunde, G.H., Eibach, R., Dal Vesco, L., Nodari, R.O., Welter, L.J., (2017). Behavior of grape breeding lines with distinct resistance alleles to downy mildew (Plasmopara viticola). Crop Breed. Appl. Biotechnol. 17, 141–149. https://doi.org/10.1590/1984-70332017v17n2a21
56. Sargolzaei, M., Maddalena, G., Bitsadze, N., Maghradze, D., Bianco, P.A., Failla, O., Toffolatti, S.L., De Lorenzis, G., (2020). Rpv29, Rpv30 and Rpv31: Three Novel Genomic Loci Associated With Resistance to Plasmopara viticola in Vitis vinifera. Front. Plant Sci. 11, 562432.https://doi.org/10.3389/fpls.2020.562432
57. Schneider, C., Onimus, C., Prado, E., Dumas, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Dorne, M.A., Lacombe, M.C., Piron, M.C., Umar-Faruk, A., Duchêne, E., Mestre, P., Merdinoglu, D., (2019). INRA-ResDur: the French grapevine breeding programme for durable resistance to downy and powdery mildew. Acta Hortic. 207–214. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1248.30
58. Sun, L., Li, S., Jiang, J. et al. (2020). New quantitative trait locus (QTLs) and candidate genes associated with the grape berry color trait identified based on a high-density genetic map. BMC Plant Biol 20, 302. https://doi.org/10.1186/s12870-020-02517-x
59. Stupić, D., Bauer, N., Jagić, M., Lucić, A., Mlinarec, J., Malenica, N., Karoglan Kontić, J., Maletić, E., Leljak Levanić, D., (2019). Reproductive potential of the functionally female native Croatian grapevine "Grk bijeli." VITIS Journal of Grapevine Research, 61-70. https://doi.org/10.5073/VITIS.2019.58.61-70
60. Töpfer, R., Hausmann, L., Harst, M., Maul, E., Zyprian, E., Eibach, R., (2011). New Horizons for Grapevine Breeding. Fruit, Veg. and Cereal Sci. and Biotech. 5 (Spec. Iss. 1), 79-100 ©2011 Global Sci Books
61. Venuti, S., Copetti, D., Foria, S., Falginella, L., Hoffmann, S., Bellin, D., Cindrić, P., Kozma, P., Scalabrin, S., Morgante, M., Testolin, R., Di Gaspero, G. (2013). 'Historical Introgression of the Downy Mildew Resistance Gene Rpv12 from the Asian Species Vitis amurensis into Grapevine Varieties', *PLoS ONE*. Edited by J. C. Nelson, 8(4), p.e61228. doi: 10.1371/journal.pone.0061228.
62. Vokurka, A. (2006). Oplemenjivanje voćaka i vinove loze-interna skripta. Agronomski fakultet, Zagreb.
63. Wang, W.Q., Song, S.Q., Li, S.H., Gan, Y.Y., Wu, J.H., Cheng, H.Y. (2011). "Seed dormancy and germination in Vitis amurensis and its variation," Seed Science Research. Cambridge University Press, 21(4), 255–265. doi: 10.1017/S0960258511000225.
64. Welter, L.J., Göktürk-Baydar, N., Akkurt, M. et al. (2007). Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). Mol Breeding 20, 359–374. https://doi.org/10.1007/s11032-007-9097-7
65. Wong, F., Burr, H., Wilcox, W. (2001) Heterothallism in Plasmopara viticola. Plant Pathol. 50, 427–432. https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00573.x
66. Yobrégat, O., (2018). Introduction to resistant vine types : a brief history and overview of the situation. OENO One 52, 241–246. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2018.52.3.2220
67. Yu, Y., Zhang, Y., Yin, L., Lu, J., (2012). The Mode of Host Resistance to *Plasmopara viticola* Infection of Grapevines. Phytopathology® 102, 1094–1101. https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-12-0028-R
68. Zini, E., Dolzani, C., Stefanini, M., Gratl, V., Bettinelli, P., Nicolini, D., Betta, G., Dorigatti, C., Velasco, R., Letschka, T., Vezzulli, S., (2019). R-Loci Arrangement Versus Downy and Powdery Mildew Resistance Level: A Vitis Hybrid Survey. IJMS 20, 3526. https://doi.org/10.3390/ijms20143526

Popis korištenih izvora – poveznica:

https://www.cabi.org/isc/datasheet/41918 u tekstu navedeno kao (CABI/ISC, 2019.) pristup 28.12.2020.
http://www.hort.cornell.edu/reisch/grapegenetics/breeding/crossing1.html u tekstu navedeno kao (Reisch, 2001.) pristup 19.12.2020.
https://www.researchgate.net/publication/262380447_Breaking_dormancy_and_predicting_germination_of_grape_seeds u tekstu navedeno kao (Thaipong I sur., 2007) pristup 5.1.2021.

Geoportal https://geoportal.dgu.hr/ pristup 15.12.2020.

Direktiva 2009/128/EC Europskog Parlamenta i Vijeća od 21. listopada 2009.: uspostavljanje okvira za djelovanje Zajednice pri postizanju održive uporabe pesticida https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32009L0128 pristup 21.12.2020.

Direktiva 2001/18/EC Europskog Parlamenta i Vijeća od 12. ožujka 2001.: o namjernom puštanju u okoliš genetski modificiranih organizama i ukidanju Direktive Vijeća 90/220/EEC - https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32001L0018&qid=1610608222134

Regulativa (EU) No 1308/2013 Europskog Parlamenta i Vijeća od 17. prosinca 2013.: uspostavljanja zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda i ukidanja propisa Vijeća (EEC) No 922/72, (EEC) No 234/79, (EC) No 1037/2001 i (EC) No 1234/2007 https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32013R1308&qid=1610608376518

Vitis internacionalni katalog – podatci o oplemenjivanju i genetici vinove loze https://www.vivc.de/index.php?r=loci%2Findex posljednji pristup 11.1.2021.

Rasprostranjenost svjetskih sorata vinove loze http://www.oiv.int/en/oiv-life/the-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties-new-oiv-study-available u tekstu navedeno kao (OIV, 2017.) pristup 19.12.2020

7. Prilozi

Prilog 7.1. Tablica lokusa otpornosti na plamenjaču vinove loze (prilagođeno po uzoru na originalni rad)

Simbol	*Kromosom*	*Izvorni genotip*	*Vrsta u kojoj je pronađeno svojstvo*	*Izvor*
Rpv1	12	28-8-78	*M. rotundifolia*	Merdinoglu et al. (2003)
Rpv2	18	8624	*M. rotundifolia*	Wiedemann-Merdinoglu et al. (2006)
Rpv3	18	Regent; Bianca		Welter et al. (2007); Bellin et al. (2009)
Rpv4	4	Regent		Welter et al. (2007)
Rpv5	9	Gloire de Montpellier	*V. riparia*	Marguerit et al. (2009)
Rpv6	12	Gloire de Montpellier	*V*. riparia	Marguerit et al. (2009)
Rpv7	7	Bianca		Bellin et al. (2009)
Rpv8	14	V. amurensis Ruprecht	*V. amurensis*	Blasi et al. (2011)
Rpv9	7	V. riparia W63	*V. riparia*	Moreira et al. (2011)
Rpv10	9	Solaris	*V. amurensis*	Schwander et al. (2012)
Rpv11	5	Regent		Fischer et al. (2004)
Rpv12	14	99-1-48; 20/3	*V. amurensis*	Venuti et al. (2013)
Rpv13	12	V. riparia W63	*V. riparia*	Moreira et al. (2011)
Rpv14	5	Börner	*V. cinerea*	Ochssner et al. (2016)
Rpv15	18	V. piasezkii (DVIT2027)	*V. piasezkii*	Pap et al. (in preparation)
Rpv16				Pap et al. (in preparation)
Rpv17	8	Horizon		Divilov et al. (2018)
Rpv18	11	Horizon		Divilov et al. (2018)
Rpv19	14	V. rupestris B38	*V. rupestris*	Divilov et al. (2018)
Rpv20	6	Horizon		Divilov et al. (2018)
Rpv21	7	Horizon		Divilov et al. (2018)
Rpv22				Fu et al. (2020)
Rpv23				Fu et al. (2020)
Rpv24				Fu et al. (2020)
Rpv25	15	Shuangyou	*V. amurensis*	Lin et al. (2019)
Rpv26	15	Shuangyou	*V. amurensis*	Lin et al. (2019)
Rpv27	18	Norton	*V. aestivalis*	Sapkota et al. (2019)
Rpv28	10	V. rupestris B38	*V. rupestris*	Bhattarai et al. (2020)
Rpv29	14	Mgaloblishvili	*V. vinifera*	Sargolzaei et al. (2020)
Rpv30	3	Mgaloblishvili	*V. vinifera*	Sargolzaei et al. (2020)
Rpv31	16	Mgaloblishvili	*V. vinifera*	Sargolzaei et al. (2020)

Izvor:https://www.vivc.de/docs/dataonbreeding/20201009_Table%20of%20Loci%20for%20Traits%20in%20Grapevine.pdf (pristup 5.1.2021.)

Prilog 7.2. Tablica koja opisuje dosad poznate QTL-ove za vinovu lozu:

Nazivi i opisi svojstava iz Slike 2.3.1. (poglavlje 2.3.), prevedeno po uzoru na originalni rad

Naziv lokusa	**Puni naziv i opis**
5GT	5-glukoziltransferaza/Stvaranje antocijanin diglukozida
BBr	Kretanje pupova
BeCo	Boja kožice
Be size	Veličina bobice
Flb	Bobice bez mesa
Fti	Vrijeme cvatnje
Gai	Neosjetljivost na giberelinsku kiselinu/**patuljak mutant** (dwarf mutant)
Lin	Linalol
MA	Sadržaj jabučne kiseline u moštu
MJR	Otpornost na nematodu korijenovih kvržica/*Meloidogyne javanica*
Mtc	Sadržaj monoterpena
OMT	O-metiltransferaza/Stvaranje izobutil-metoksipirazina (IBMP)
PdR	Otpornost na uzročnika Pierceove bolesti/*Xylella fastidiosa*
Rcg	Otpornost na bakterijski tumor vinove loze/*Agrobacterium vitis*
Rda1; 2	Otpornost na crnu pjegavost rozgve/*Diaporthe ampelina/Phomopsis*
Rdv	Otpornost na filokseru/*Daktulosphaira vitifolia*
Ren; Run	Otpornost na pepelnicu/*Erysiphe necator syn. Uncinula necator*
Rgb1; 2	Otpornost na crnu trulež boba/*Guignardia bidwellii*
Rpv	Otpornost na plamenjaču/*Plasmopara viticola*
SdI	Inhibitor razvoja sjemena/stenospermokarpska besjemenost
Sen	Osjetljivost na pepelnicu/*Erysiphe necator*
Sex	Spol/tip cvijeta
SS	Udio topivih tvari u moštu
Ufgt	Glikozilacija katalizirana UDP-glukozom-antocijanidin-flavonoid-glukoziltransferazom
Ver1; 2	Šara/početak dozrijevanja grožđa
XiR	Otpornost na fitoparazitnu nematodu *Xiphinema index*
YAN	Sadržaj kvascima dostupnog dušika u moštu (eng. *Yeast assimilable nitrogen*)

Izvor: Delrot, S., Grimplet, J., Carbonell-Bejerano, P., Schwandner, A. i sur. (2020). Genetic and Genomic Approaches for Adaptation of Grapevine to Climate Change. In: Kole C. (eds) Genomic Designing of Climate-Smart Fruit Crops. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97946-5_7.

Životopis

Viktorija Grubišić, rođena je u gradu Zagrebu 1. siječnja 1996. godine. Srednju školu, XVI. gimnaziju, pohađala je od 2010. do 2014. godine na dvojezičnom programu na hrvatskom i engleskom jeziku. 2014. godine položila je međunarodnu diplomu poznavanja njemačkog jezika, DSD – Deutsche Sprachdiplom na razini C1 za pisanje, slušanje i čitanje te B2 za govornu produkciju. Iste godine je upisala Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem je 13. rujna 2018. godine stekla akademski naziv Sveučilišna prvostupnica inženjerka Agroekologije, a svoje je obrazovanje nastavila na diplomskom studiju Hortikulture – usmjerenje vinogradarstvo i vinarstvo. Svojim izrazitim angažmanom tijekom studija, akademske godine 2019./2020. je odabrana kao jedan od pripravnika u „Miljenko Grgich Internship Program“ za obavljanje stručne prakse u Kaliforniji, pod pokroviteljstvom Hrvatske školske zaklade. Završila je tečaj medijacije u Modus Centru za djecu, mlade i obitelj što joj je značajno pomoglo u stjecanju komunikacijskih vještina i rješavanju konfliktnih situacija. Volontirala je tijekom dvije godine (2014. – 2016.) u udruzi FALA – Udruzi za promicanje socijalne osjetljivosti, zaštite i poboljšanja kvalitete života i popularizaciju terapijskog i rekreativnog jahanja. Radno je aktivna od 2012. godine, a uz studijske obveze, od 2015. godine je stalno zaposlena na različitim studentskim poslovima. Iznimno je svestrana, aktivna i odgovorna osoba, voljna učiti i savladavati nove izazove, timski je igrač izraženih komunikacijskih vještina.