Aklimatizacija biljaka sorte Babić (Vitis vinifera L.) razmnoženih u kulturi tkiva in vitro

Car, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:204:914781

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

Antonija Car

Aklimatizacija biljaka sorte Babić (*Vitis vinifera L.*) razmnoženih u kulturi tkiva *in vitro*

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Antonija Car

Aklimatizacija biljaka sorte Babić (*Vitis vinifera L.)* razmnoženih u kulturi tkiva *in vitro*

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić,
Neposredni voditelj: dr. sc. Zvjezdana Marković

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana _____

S ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić _____
2. Prof. dr. sc. Edi Maletić _____
3. Doc. dr. sc. Darko Preiner _____

SAŽETAK

Babić je jedna od autohtonih dalmatinskih sorti, a nalazi se na Nacionalnoj listi priznatih kultivara vinove loze. Najviše vinograda ove sorte nalazi se u vinogradarskoj podregiji Sjeverna Dalmacija. Tijekom postupka utvrđivanja zdravstvenog stanja hrvatskih autohtonih sorti, kod sorte Babić nije pronađen niti jedan trs koji nije zaražen gospodarski značajnim virusima. To nameće potrebu za ozdravljivanjem i stvaranjem zdravog biljnog materijala.

Materijal Babića je ozdravljen kulturom meristema te mikropropagacijom održavan u *in vitro* uvjetima kao potencijalni bezvirusni materijal za proizvodne nasade. S obzirom da za stvaranje značajne količine biljaka i njihov uspješan prijenos iz *in vitro* u *in vivo* uvjete treba provesti aklimatizaciju, bilo je potrebno utvrditi dinamiku rasta izboja u različitim posudama (epruvete, „frutke“) te pokušati procjeniti utjecaj veličine biljaka koje ulaze u postupak aklimatizacije na njihovo preživljavanje nakon prijenosa u *in vivo* uvjete.

U istraživanje je bila uključena hrvatska autohtona sorta Babić te kao kontrola sorta Porton koja je adaptibilna na *in vitro* uvjete i svjetski poznata sorta Pinot crni. Multiplikacija je provođena metodom nodijskih odsječaka na MS mediju. Kulture su rasle u komori rasta pri dnevnoj temperaturi od 27 ºC, fotoperiodu 16/8 i intenzitetu svjetla od 3000 lux-a. Nakon postizanja zadovoljavajuće visine, odabrane su biljke za aklimatizaciju koja je provedena u “mini plasteniku” unutar atmosfere laboratorija.

Izbor posude nije značajno utjecao na rast u početnoj kulturi, no visina i broj novostvorenih nodija značajno su se razlikovale ovisno o odabranoj posudi za kulturu tkiva. Najviši multiplikacijski indeks je zapažen kod sorte Babić. Kod aklimatizacije, biljke sorte Porton iz epruveta dale su najbolje rezultate. Kod sorte Babić biljke veće od 3 cm imale su višu stopu preživljavanja od biljaka manjih od 3 cm. Potrebno je provesti daljnja istraživanja svakog pojedinog korakak aklimatizacije za sorte od interesa.

Ključne riječi: vinova loza, virus-free, in *vitro*, nodijski odsječak, posuda, aklimatizacija

ABSTRACT

Babić is one of Dalmatian autochthonous cultivar and it is part of the Nacional list of approved grapevine cultivars. It is mostly planted in the subregion of North Dalmatia. In the recent survey, most of Babić vines population is highly virus infected. Thus, procedures for virus eradication and rapid multiplication of virus-free material is necessary.

Healthy plant material of cultivar Babić has been introduced and maintained in tissue culture laboratory in Zagreb. This material was tested in rapid multiplication and acclimatization conditions. This reseach revealed the procces of going from in vitro to in vivo conditions defining the growth dynamic of plantlets in different glassware (tubes and vessel) and the size of plants on survival in process of acclimatization.

In this research, plant material included were: cultivar Babić and cultivars Porton (good in vitro adaptibilitiy) and Pinot noir (internationaly known). Nodal segments of healthy genotype were cultivated in *in vitro* conditions on medium MS medium. Cultures were grown in growth chamber at daily temperature of 27 ºC, photoperiode 16/8 and light intensity of 3000 lux. „Mini greenhouse“ was used for plants acclimatization.

Choice of glassware did not affect initial growth, but size and number of nodals were significantly different depending on glassware choosen after multiplication. Cultivar Babić had the highest multiplication index. In acclimatization, cultivar Porton grown in tubes gave the highest survival rate. Babić plants higher than 3 cm gave better results then plants lower then 3 cm. This reseach reveled a strong need for futher improvement of these procedures for production of healthy plant material.

Key words: grapevine, virus-free, *in vitro*, nodal segments, glassware, acclimatization

Sadržaj

SKRAĆENICE U TEKSTU **1**

1. UVOD **2**

2. PREGLED LITERATURE **4**

2.1. PRIMJENA *IN VITRO* KULTURE KOD VINOVE LOZE 4
2.2. ODABIR SASTAVA HRANIDBENE PODLOGE ZA MULTIPLIKACIJU 5
2.3. ODABIR SORTIMENTA ZA ISTRAŽIVANJE 7
2.3.1. Babić *7*
2.3.2. Pinot crni *9*
2.3.3. Porton *10*
2.4. AKLIMATIZACIJA 11
2.5. OČUVANJE I OZDRAVLJIVANJE SORTIMENTA 13

3. PROBLEM I CILJ RADA **15**

4. MATERIJALI I METODE **16**

4.1. *IN VITRO* KULTURA VINOVE LOZE 16
4.2. ODABIR I PRIPREMA SASTAVA HRANIDBENE PODLOGE 16
4.3. SORTE U ISTRAŽIVANJU 18
4.4. PROVOĐENJE MULTIPLIKACIJE I MJERENJE RASTA I RAZVOJA BILJAKA 18
4.5. AKLIMATIZACIJA 20

5. REZULTATI **24**

5.1. *IN VITRO* KULTURA VINOVE LOZE 24
5.1.1. Utjecaj rasta i razvoja inokuliranih nodijskih odsječaka *24*
5.1.2. Utjecaj sorte i posude za kulturu tkiva na rast i razvoj biljaka nakon multiplikacije *25*
5.2. UTJECAJ PROCESA AKLIMATIZACIJE BILJAKA NA RAST I RAZVOJ BILJAKA NAKON IZNOŠENJA IZ *IN VITRO* UVJETA 29
5.2.1. Predpokus aklimatizacije *29*
5.2.2. Pokus aklimatizacije *31*

6. ZAKLJUČCI **34**

7. LITERATURA: **36**

8. ŽIVOTOPIS **41**

Skraćenice u tekstu

Murashige i Skoog medij - MS medij

6-benzilaminopurin - BA

1-naftalenoctenom kiselinom - NAA

indolil-3-maslačna kiselina – IBA

Grape fanleaf virus – GFLV (Virus lepezastog lista vinove loze)

Woody Plant Medium – WPM

The United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization – UNESCO

1. UVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera L.)* je najrasprostranjenija voćna vrsta u svijetu, koja svojom ukupnom proizvodnjom nadmašuje sve ostale (Maletić i sur., 2008). Veliki ekonomski značaj postiže ne samo zbog vinske industrije nego i zbog proizvodnje zobatica i suhica (Vivier i Pretorius, 2002). Ova drvenasta, višegodišnja biljka pripada porodici lozica (*Vitaceae*) te euro-azijskoj skupini roda *Vitis*. Prvi dokazi o njenom uzgoju potječu još iz vremena neolitika (6000-5000 g. pr. Kr.), a spravljanje vina prvi puta se spominje u razdoblju između 5000 – 5400 godina prije Krista na području današnjeg sjevernog Irana (Mirošević, Karloglan Kontić, 2008).

Zbog vegetativnog načina razmnožavanja kojim se vjerno prenose svojstva sorte, vinova loza je izložena zarazi virusima koji smanjuju prinos i kakvoću grožđa te time značajno utječu na ekonomičnost uzgoja vinove loze (Walter i Martelli, 1997). Zbog toga je potrebno proizvoditi zdravi (bezvirusni, „virustested“) sadni materijal, odnosno razmnožavanje reznicama vršiti samo sa matičnih trsova koji dokazano nisu zaraženi ekonomski značajnim virusima. Posljednja istraživanja govore da čak 60 virusa može inficirati vinovu lozu od kojih su najznačajniji virusi vinove loze u Hrvatskoj virusi uvijenosti lista tip 1 (GFLrV-1) i tip 3 (GFLrV-3) (Martelli, 2009; Karoglan Kontić i sur., 2009). U Hrvatskoj se još uvijek podižu nasadi sa sadnim materijalom kategorije standard koji nije direktno testiran na viruse.

Bogatstvo autohtonih sorata vinove loze koje Hrvatska ima važno je očuvati te revitalizirati njihov uzgoj (Pejić i Maletić, 2010). Međutim, istraživanja su pokazala da u populaciji nekih sorata, posebno autohtonih, nije moguće pronaći niti jedan nezaraženi trs (Karoglan Kontić i sur., 2009). Upravo takav primjer je hrvatska autohtona sorta Babić. Na sreću, kod ove sorte virusi su eliminirani kulturom meristema te je njezin bezvirusni materijal sada dostupan za daljnja istraživanja.

Kultura biljnoga tkiva *in vitro* je do sada jedina djelotvorna tehnika kojom se iz zaraženih mogu dobiti zdrave biljke oslobođene od virusa. Također čuvanje genetičkog materijala *in vitro* je sigurnije je od poljskih kolekcija *ex situ*. Kontrolirani uvjeti *in vitro* su sterilni laboratorijski uvjeti u kojima su biljke smještene u epruvetama (staklenkama) na odgovarajućem hranidbenom

mediju koji sadrži sve potrebno za njihov daljnji rast. Tehnike *in vitro* posebno su pogodne za čuvanje biljnog materijala jer se u pravilu materijal može čuvati u malom broju primjeraka, zdrav, oslobođen patogena i u uvjetima koji usporavaju rast (Jelaska, 1994).

Kako bismo multiplicirani biljni materijal mogli vratiti u proizvodne nasade, biljke treba provesti kroz proces aklimatizacije što predstavlja kritičan period i ograničava uspjeh. Potrebno je utvrditi optimalne uvjete za aklimatizaciju biljnog materijala kako bi bilo moguće stvoriti bezvirusni sadni materijal koji će biti od koristi vinogradarima za postizanje većih prinosa u proizvodnim nasadima.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Primjena *in vitro* kulture kod vinove loze

Danas je kultura tkiva *in vitro* općeprihvaćena, isplativa i provjerena tehnika za razmnožavanje mnogih vegetativno razmnožavanih biljnih vrsta u poljoprivredi, šumarstvu i biotehnologiji (Nasr El-Din i sur., 1997; Kereša i sur., 2012; Mengesha i sur., 2013). Dok je konvencionalna proizvodnja ograničena dormancijom sjemena i reznica, pojavom heterozigotnosti i nedovoljnim prostorom, *in vitro* razmnožavanje (mikropropagacija) odvija se u aseptičnim uvjetima, bez virusa i patogena te se može neprekidno odvijati tijekom cijele godine (Lewandovski, 1991).

Mikropropagacija je pogodna za brzo razmnožavanje rijetkih i elitnih genotipova te njihovo čuvanje i eliminaciju virusa. Multiplikacijom mladice s 3 nodija, nakon 330 dana, dobiva se 75 000 000 novih biljaka (Chee, 1984). Kao negativnost ističe se gubitak velikog postotka eksplantata tijekom multiplikacije i prijenosa u *ex vitro* uvjete te pojava mutacija (Pospišilova i sur., 1999). Veliki multiplikacijski indeks, upotreba jeftinijih kemijskih sredstava, visok postotak zakorjenjivanja i postotak preživljavanja biljaka te metoda zakorijenjavanja *ex vitro* mogu smanjiti troškove proizvodnje i popularizirati ovu metodu razmnožavanja (Singh, 2015).

Njemački znanstvenik Gottlieb Haberland 1902. godine je započeo s izolacijom biljne stanice i njezine kulture u *in vitro* uvjetima na umjetnoj hranidbenoj podlozi te ga smatramo pionirom kulture tkiva. U periodu između 1940. do 1960. godine postignut je najveći napredak na tom području (Thorpe, 2007). Prva istraživanja *in vitro* kulture na vinovoj lozi objavio je Morel (1944). Od tada su mnoga istraživanja s različitim rezultatima rađena na razvoju kalusne kulture, kulture protoplasta, somatske embriogeneze, regeneracije biljke kroz organogenezu sa ili bez razvoja kalusa, multiplikaciji aksilarnim pupom te multiplikaciji nodijskim odsječcima (Novak i Juvova, 1982; Morini i sur.,1985; Read, 2007; Torregrosa i sur, 2001). Somatska embriogeneza i regeneracija cijele biljke prvi put je opisana u radu Mullinsa i Srinivasana (1976), a autor Raymond i sur. (1984) razvili su protokol za mikropropagaciju nodijskim odsječcima vinove loze. Sudarsono i Goldy (1988) su proučavali utjecaj regulatora rasta i vršnog pupa na uspostavu

kulture kod *Vitis rotundifolie*. Chee i Pool (1982) testirali su utjecaj regulatora rasta i fotoperioda na izdanke sorte Rougeon. Jedna od prednosti kulture tkiva je mogućnost ozdravljivanja biljaka od virusa. Ozdravljivanje od virusa je postignuto različitim metodama *in vitro* kulture: kultura meristema (Youssef i sur., 2009), kultura meristema uz primjenu termoterapije (Barlass, 1978) i krioterapija (Wang i sur., 2008). Kod istraživanja s temom kulture tkiva cilj je razvoj efikasnih protokola za dugo čuvanje genetskih resursa vinove loze *in vitro*, što je sigurnija i jeftinija alternativa nasadima *in situ* (Roubelakis-Angelakis, 2010).

Brza multiplikacija biljka vinove loze postignuta je metodom nodijskih odsječaka s jednim aksilarnim pupom (Nas i sur., 2005). Uz racionalizaciju vremena, ova metoda je najsigurniji način za dobivanje *true to type* biljaka izbjegavanjem somaklonske varijabilnosti koju asociramo s pojavom hiperhidracije ili prethodno zvane *vitrifikacije* u kulturi tkiva (Singh, 2015). Fiziološke deformacije kao što su intenzivna hidratacija, niska lignifikacija, oslabljena fukcija puči i smanjena mehanička čvrstoća biljaka regeneriranih u kulturi tkiva mogu biti uzrokovane pretjeranim dodatkom citokinina u hranidbenu podlogu, te treba biti oprezan s koncentracijama citokinina da bismo izbjegli iste (Heloir i sur., 1997).

2.2. Odabir sastava hranidbene podloge za multiplikaciju

Veliki broj istraživanja posvećen je odabiru prikladne hranidbene podloge. Sve podloge sadržavaju mineralne soli, izvor ugljika (obično šećer saharoza) i organske dodatke kao što su vitamini i amino kiseline. Ovisno o fazi kulture biljnog tkiva, u baznu podlogu dodaju se regulatori rasta (Novak i Juvova 1982; Chee i sur. 1984).

Najčešće korištena hranidbena podloga za kulturu tkiva općenito, tako i za vinovu lozu, je Murashige i Skoog (MS) medij (Murashige i Skoog, 1962). U MS medij dodaje se citokinin 6-benzilaminopurin (BA) (Harris i Stevenson, 1982; Barlass i Skene, 1980), ponekad i u kombinaciji sa auksinom 1-naftalenoctenom kiselinom (NAA) (Chee i sur., 1984). Kombinacija različitih citokinina kao što su tidiazuron i kinetin su efektniji za uspostavu morfogenetske kulture kod sorti vrste *Vitis vinifera*, a BA za vrstu *Vitis rotundifolia* (Sudarsono i Goldy, 1988). Treba obratiti pozornost na koncentracije jer upotreba citokinina može rezultirati nepoželjnim mutacijama (Beauchesne, 1982). Tijekom multiplikacije na sorti Norton (*V. aestivalis*) ispitivane

su različite koncentracije citokinina koje su trebale potaknuti grananje i stvaranje većeg broj nodija. Koncentracija od 8 μM BA dala je lošu kvalitetu, a koncentracije od 2 i 4 μM zadovoljavajuću kvalitetu biljaka (Bigger, 2010). Koncentracija od 8.9 μM BA dodanog u MS medij je optimalna koncentracija za uspostavu kulture tkiva, dok je za supkultiviranje potrebno reducirati koncentracije na 4.4 μM BA kako bi se spriječila *vitrifikacija*. Između dva auksina testiranih za zakorijenjivanje (NAA i indolil-3-maslačna kiselina - IBA), IBA u koncentraciji od 2.5 μM pokazao je dobro formiranje korijenja u 100% slučajeva (Heloir i sur. 1997). U istraživanju utjecaja regulatora rasta na iranskim sortama Soltanin i Sahebi pokazalo se da je za uvođene kulture tkiva u uvjete *in vitro* najpogodnije u MS medij dodati 1.5 mg/L BA ili 1 mg/L IBA. Te dvije kombinacije postigle su najveći broj izdanaka po posađenom nodiju (3.8 – 5.4) (Aazami, 2010).

Kod hrvatskih autohtonih sorti, MS medij pokazao se kao najpogodniji za mikropropagaciju *cv.* Vugava (*Vitis vinifera L.)* u usporedbi sa ½ MS ili WPM medijem. Uzgojem kultura Plavca malog i Vugave, povećana koncentracija BA (8.9 μM) izazvala je nastajanje izbojaka sa kompaktnim nodijima i abnormalnim oblikom listića, dok je tretman sa 4.4 μM uzrokovao manje kompaktniji, izduženiji tip izbojaka te normalne listiće (Hartl i Maleš, 2000).

Testiranjem 8 hrvatskih autohtonih sorata (Plavac mali, Maraština, Pošip, Debit, Grk, Lasina, Plavina i Vugava) u *in vitro* uvjetima, pokazalo se da reakcija na odabir medija, može uvelike ovisiti o genotipu, ali i virusnoj zarazi koju određeni genotip ima. Odabrana su tri tipa medija: M1- polovični MS, M2 – potpuni i M3 – potpuni MS s dodatkom 4.4 μM/L BA-a. Sorta Plavac mali imala je postotak preživljavanja viši od 90% bez obzira na tip medija. Na mediju M2 sorte Debit, Grk i Lasina pokazale su niže rezultate (57.1 – 61.0%), a sorte Grk i Plavina na M3 mediju tek 36.4 i 64.3%. Značajne razlike u rastu su zabilježene između zdravih i zaraženih genotipova. Skoro svi zdravi genotipovi pokazali su rast, dok se pad u rastu dogodio kod zaraženih na 5.5 - 31.4%. Zdravi genotipovi postigli su prosječan rast od 6.3 cm, dok je Plavac mali zaražen GFLV dosegao svega 2.6 cm (Marković i sur.,2014).

2.3. Odabir sortimenta za istraživanje

2.3.1. Babić

Sorta Babić ima jedinstven genetički profil. Uzgaja se na području oko Šibenika, Biograda, Kaštela i na otoku Korčuli. Nazivaju ju još i Šibenčanac, Rogozničanin i Rogoznička. U bliskoj rodbinskoj vezi je s sortom Dobričić. Smatramo ju autohtonom dalmatinskom sortom, a nalazi se na Nacionalnoj listi priznatih kultivara vinove loze kao preporučena za sljedeće podregije: Sjeverna Dalmacija, Srednja i južna Dalmacija te Dalmatinska zagora (Karoglan Kontić, Maletić, 2015).

Trs je slabo do srednje bujan. Grozd srednje velik do velik, rastresit do srednje zbijen, piramidalan, često s izraženim krilcem ili sekundarnim grozdom. Bobica je okrugla, srednje velika do velika. Kožica je tanka, tamnoplava, obilno prekrivena maškom. Dozrijeva srednje kasno, u III. ili početkom IV. razdoblja. Rodnost je dobra i redovita, ali sorta je osjetljiva na gljivične bolesti. Slatko, sočno, blago aromatično meso daje vina različite kakvoće. Potencijal sorte je visok i ovisi o okolišnim uvjetima. Jedan od najpoznatijih položaja na kojemu se Babić uzgaja su čuvene primoštenske terase (položaj Bucavac) koje su kandidat za listu UNESCO-a. Na takvim škrtim, kamenitim položajima okrenutima prema moru prinosi će biti niži, ali kakvoća vrhunska. Sortna vina su intenzivne, rubinskocrvene boje, jaka i puna, s aromama prezrelog voća. Blagi tanini dopuštaju potrošnju Babića kao mladog vina (Karoglan Kontić, Maletić, 2015).



Slika 1. Grozd Babića (izvor: vinopedia.hr)

Tablica 1: Površina i broj trsova sorte Babić prema županijama (izvor: Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju, 2015.)

Županije	**Površina (ha)**	**Broj trsova**
Šibensko-kninska	165,78	972 359
Splitsko-dalmatinska	66,28	388 492
Zadarska	35,27	192 322
Dubrovačko-neretvanska	9,5	57 123
Primorsko-goranska	1,21	7 230
Ličko-senjska	0,46	3 250

Prema podacima Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju iz 2015. godine ukupna površina pod vinogradima u Republici Hrvatskoj iznosila je 20.881,77 ha, od toga 294,67 ha zasađeno je sortom Babić (Tablica 1). Najviše vinograda ove sorte nalazi se u vinogradarskoj podregiji Sjeverna Dalmacija gdje je po zastupljenosti na prvom mjestu. Površinom od 186,04 ha čini više od polovice ukupne površine Babića u cijeloj Hrvatskoj (Tablica 2).

Tablica 2: Deset najzastupljenijih sorata u podregiji sjeverna Dalmacija (Izvor: Agencija za plaćanje u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom turizmu, 2015.)

r.br.	Naziv sorte	Površina (ha)	Broj trsova
1.	BABIĆ = Šibenčanac, Babičević, Pažanin, Roguljanac	186,04	1 116 565
2.	Plavina Crna = Plavka, Plavinac, Modrulj, Plajka	134,64	802 785
3.	Plavac mali crni = Plavac, Mali, Crljenak mali, Crljenac, Pagadebit crni, Zelenka, Zelenjak greštavac	92,28	614 964
4.	Debit = Puljižanac, Bilina, Bjelina, Čarapar, Debić	84	471 029
5.	Pošip bijel i= Pošip, Pošipak, Pošipica	41,71	319 826
6.	Maraština = Rukatac, Kaćadebit, Maraškin, Mareština, Krizol, Višana	38,27	216 478
7.	Cabernet sauvignon = Kaberne Sovinjon, C.S.Noir, Petit C., Vidure Sauvignon, Carbonet	37,01	170 866
8.	Tribidrag = Zinfandel, Primitivo, Pribridrag, Crljenak, Crljenak kaštelanski	30,57	214 224
9.	Victoria	27,27	67 802
10.	Merlot = Merlaut noir, Merlo, Plant Medoc, Vitraille	24,89	116 957

2.3.2. Pinot crni

Sorta Pinot crni potječe iz Francuske i smatra se jednim od najstarijih kultivara. Danas je ova sorta rasprostranjena po cijelom svijetu, a u Hrvatskoj se uzgaja u regiji Kontinentalna Hrvatska i u Istri. Srednje je bujan. Prinosi su redoviti i relativno niski. Dozrijeva u I. razdoblju. Vino je vrhunske kakvoće, rubinski crvene boje. Skladno je i meko te pogodno za čuvanje (Mirošević i Kontić, 2008).

U Francuskoj, nalazimo ju pod sinonimima Pineau de Bourgoyne, Franc Pineau, Noirien, Franc Noirien, Salvagnin, Morillon, Auvernat, Auvernaut noir, Plant Doré te Vert Doré. U Njemačkoj nazivaju ju Burgunder blauer, Blauer Spätburgunder, Clävner, Blauer Klävner,Schwarzer Riesling, Möhrchen i Schwarzer Burgunder, u Italiji Pinot nera, u Austriji, Blauer Nürnberger, a u Mađarskoj Nagyburgundi (iv.ucdavis.edu).



Slika 2. Pinot crni (izvor: wine-searcher.com)

Pinot je sorta sklona somatskim mutacijama (Hocquigny et al., 2004; Lacombe et al., 2011). Najviše promjena uočeno je na izvornoj crnoj kožicici bobice Pinota crnog, što je rezultiralo pojavom Pinota sivog i Pinota bijelog. Velika vjerojatnost je da je P. bijeli nastao iz P. sivog koji se razvio mutacijom iz P.crnog, iako to nije u potpunosti istraženo (Viala and Vermorel, 1909; Pelsy, 2010).

2.3.3. Porton

Porton je crna sorta vinove loze. Nastao je 1958. godine križanjem sorte Grenache crni i Blauer Portugieser (Portugizac) u francuskom Nacionalnom institutu za agronomska istraživanja (Institut National de la Recherche Agronomique - INRA) pod nazivom E.M. 1508-25 koji je

trenutno jedini sinonim. Cilj križanja je bio dobiti sortu s ranijim vremenom dozrijevanja od Grenacha za hladnija područja uzgoja. U uzgoju je na manjim površinama u Languedocu u Francuskoj. Plasiranje vina ove sorte dozvoljeno je pod kategorijom *Vin de pays d'Oc* te podkategorijom *Vin de Pays de l'Aude*. Koristi se u bledovima s sortama Carignan i Grenache. Vinifikacijom daje meka, bogata, voćna vina s izraženim aromama jagode. Sorta je često korištena u mnogim biotehničkim istraživanjima (Torregrosa, 2002., Torres-Viñals, 2004).

2.4. Aklimatizacija

Kada se proizvede dovoljan broj biljaka u laboratorijskim uvjetima, potrebno ih je zakorijeniti i posaditi u supstrat. Zbog razlika između uvjeta razmnožavanja *in vitro* i *in vivo,* najprije je potrebno provesti postepenu prilagodbu fizioloških i anatomskih karakteristika biljaka, tj. aklimatizaciju, što predstavlja ključan trenutak pri kojemu dolazi do određenog gubitka biljaka (Seelve, J.F, 2003, Levandowski, 1991). Cilj unaprijeđenja koraka aklimatizacije je ostvariti što veći broj preživjelih biljaka koje će uspješno nastaviti svoj rast u atmosferskima uvjetima.

U početnim istraživanjima, loši rezultati aklimatizacije i postavljanja *in vitro* biljaka u vanjske uvjete bili su prepreka za komercionalni način ovakvog razmnožavanja biljaka (Swartz i Lindstrom, 1986). Mali pomak dogodio se obogaćivanjem atmosfere komore rasta ugljikovim dioksidom tijekom prve faze aklimatizacije kada dolazi do boljeg rasta izdanaka i korijena biljaka (Faulks i Mudge, 1988; Lakso i sur. 1986).

In vitro biljke su uzgajane u jedinstvenoj atmosferi unutar malog prostora staklenke koje omogućavaju minimalan stres i optimalne uvjete za rast (Hazarika, 2003). Visoka relativna vlažnost, slabo osvjetljenje, sterilni uvjeti zaštićeni od patogena, zadebljala kutikula i ograničena izmjena plinova razlikuju *in vitro* način od konvencionalnog načina uzgoja biljaka (Pospišilova, 1999).

Tijekom *in vitro* razmnožavanja, biljke su fotosintetski neaktivne jer medij za rast sadrži sva potrebna hranjiva i hormone te one razvijaju heterotrofni način ishrane koristeći kao izvor ugljikovog dioksida saharozu iz medija (Seelye, 2003; Hazarika, 2003). Također, visoka vlažnost

(viša od 95%) unutar posude ne dozvoljava zadovoljavajuć razvoj kutikule lista (Gill, 1997). Također, rast i razvoj same biljke i njezinog korijena bitni su za uspjeh aklimatizacije. Veličina mikroreznice proporcionalno diktira snagu i sposobnost za preživljavanje stresa aklimatizacije (Mohammed i Vidaver, 1990). *In vitro* zakorijenjene biljke imale su veći postotak preživljavanja od *in vivo* zakorijenjenih biljaka. U procesu aklimatizacije *in vivo* zakorijenjene biljke trebale su puno kraće vrijeme za prilagodbu na vanjske uvjete što je skratilo ukupno vrijeme proizvodnje (Aazami, 2010).

Proces aklimatizacije je provođen na 4 do 5 tjedana starim biljkama sorte Norton (*Vitis aestivalis*). Nakon rasta u *in vitro* uvjetima, premještene su u vlažan supstrat u posudice s poklopcima, uz atmosferske uvjete kakvi su bili tijekom multiplikacije. Nakon 4 dana, biljke su posađene u medij sačinjen od 34% mahovine, 31% perlita, 31% vermiculita i 4% zemlje, u plastične posude od 1 litre i premještene u staklenik sa djelomičnim zasjenjivanjem. Plastični poklopci otvarani su postepeno tijekom četiri tjedna. Pokus je rađen u kasno proljeće. Rezultati istraživanja pokazali su da je *ex vitro* ukorjenjivanje sa bazalnim umakanjem u 1000 ppm (0.1%) IBA-e na 5 sekundi dalo 98% ukorijenjenih biljaka, a 92% bez umakanja. Visokoj uspješnosti aklimatizacije su pridonjeli: 1) endogene koncentracije auksina u mikroreznicama koje su omogućile lako zakorijenjivanje, 2) rejuvenilizacija biljaka u kulturi i 3) pozornost i savjesno provođenje koraka (Bigger, 2010).

Kod istraživanja na vrsti *Vitis labrusca* „Delaware“, pozitivni rezultati se pripisuju dodatku auksina pri zakorjenjivanju. Kombinacija NAA u koncentraciji od 0.001 mg/litri i IBA od 0.005 mg/litri u ½ MS-u postigla je više od 95% zakorjenjivanja u 10 dana. Također više od 95% zakorjenjenih biljaka uspješno je aklimatizirano unutar 14 dana u plastičnim kontejnerima veličine 53 x 28 × 5 cm posude. Tjedan dana biljke su bile pokrivene plastičnim poklopcem kako bi zadržale relativnu vlažnost od 99%, a tijekom sljedećih tjedan dana poklopci su se sve više otvarali, da bi na kraju bili potpuno izloženi atmosferskoj vlažnosti zraka. Tako aklimatizirane biljke su posađene u plastične posude od 0.08 litara. Prilikom *in vitro* razmnožavanja, u ½ MS dodano je 1.0 mg/litri BA-a kako bi se potaklo grananje i stvaranje što većeg broja nodija te je potvrđeno kako je u mjesec dana moguće stvoriti oko 3000 ‘Delaware’ sadnica ovim načinom

propagacije. Autori potvrđuju da je protokol kompatibilan i kultivarima Cabernet Sauvignon, Pinot crni i Chardonnay (Lewandowski, 1991).

Visok postotak uspješnosti od 90 do 100% kod aklimatizacije dobiven je kod sorte Arka neelamani (*V. vinifera*). Biljke visoke 2 do 5 cm i stare 3 do 4 tjedna sađene su u plastične posude veličine 8 × 8 × 7.5 cm i poklopljene prozirnim plastičnim poklopcem. Poklopci su postupno otvarani svaki tjedan po principu: prvi tjedan zatvoreni, tijekom drugog tjedna polovično, a u trećem tjednu poklopci su bili potpuno uklonjeni. Tijekom ova tri tjedna intenzitet svijetla povećan je s 40 do 50 na 60 do 80 μmol m^{-2} s^{-1}. U radu je navedeno da je postupak moguće provoditi neovisno o godišnjim dobima u zaštićenim prostorima uz kontrolu svjetlosti i vlage. Uočena je i korelacija između niskog intenziteta svjetla tijekom aklimatizacije te pigmentacije na listovima i peteljkama i većeg rasta internodija (Thomas i Schiefelbein, 2001).

Prilikom provođenja aklimatizacije na više *Vitis vinifera* kultivara, 20 do 25 dana nakon zadnje multiplikacije staklenke su otvorene i biljke su u takvim uvjetima provele 7 do 9 dana. Biljke s dobro razvijenim korijenom vađene su iz staklenke i isprane vodom iz slavine kako bi se uklonio medij. Posađene su u plastične lonce veličine 500 ml napunjene zemljom, tresetom i pijeskom u omjeru 1:1:1. Kako bi zadržale vlagu, pokrivene su plastičnom čašom i zalijevane jednom dnevno uz dodatak kompleksnog gnojiva. S obzirom na primjenu regulatora rasta u početnoj fazi pokusa na različitim kultivarima, postoci zakorjenjivanja variraju između 60 do 90% što pokazuje da je ovaj protokol primjenjiv i daje uspješne rezultate (Yerbolova i sur., 2013).

2.5. Očuvanje i ozdravljivanje sortimenta

Genetička raznolikost biljaka, uključujući i vinovu lozu, često se čuva u poljskim kolekcijama – bankama gena (Santana i sur., 2008). Takve kolekcije izložene su potencijalnom gubitku zbog nepovoljnih okolišnih okolnosti, napadu štetnika, problematičnom razmnožavanju i konstantnim financijskim opterećenjima te širenjima bolesti i virusa koji su prepreka za očuvanje germplazme (Engelmann, 2009).

Virusi uvijenosti lista vinove loze 1 i 3 (*grapevine leafroll-associated virus*) pripadaju ekonomski najvažnijim i najraširenijim virusima vinove loze (Martelli, 1993). Istraživanje zdravstvenog stanja hrvatskih autohtonih sorata Babica, Babić, Glavinuša, Grk, Ljutun, Maraština, Mladenka, Ninćuša, Plavina, Plavac mali, Pošip, Vlaška i Vugava u proizvodnim nasadima pokazalo je da su u velikoj mjeri zaraženi tim virusima.

3. PROBLEM I CILJ RADA

Cilj rada je provesti aklimatizaciju biljaka sorte Babić nakon razmnožavanja u kulturi nodijskih odsječaka *in vitro*, te utvrditi utjecaj staklenih posuda (epruvete, „frutke“) koje su korištene za kultiviranje *in vitro* i veličine biljaka koje ulaze u postupak aklimatizacije na njihovo preživljavanje nakon prijenosa u *in vivo* uvjete.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. *In vitro* kultura vinove loze

In vitro kultura ovog istraživanja obuhvaćala je nekoliko faza. Prva faza obuhvaćala je odabir materijala pojedine sorte koje su ranijim eksperimentima već uvedene u kulturu tkiva. U prvoj fazi je praćen uspjeh početne kulture mjerenjem rasta i razvoja biljaka odabranih sorata za ovo istraživanje (Babić, Pinot crni i Porton). U drugoj fazi odabrane sorte su multiplicirane da bismo postigli dovoljnu količinu materijala za završnu fazu istraživanja - aklimatizaciju. Kroz ovu fazu praćen je utjecaj staklenih posuda na rast i razvoj biljaka nakon svake multiplikacije. Količina početnog materijala odabranih sorata se razlikuje, kao i broj multiplikacija. U završnoj fazi su biljke koje su pokazale normalan vegetativni rast pripremljene za aklimatizaciju za vanjske uvjete. Rezultati aklimatizacije praćeni su brojem preživjelih biljaka u određenim periodima.

4.2. Odabir i priprema sastava hranidbene podloge

Za *in vitro* sadnju nodijskih odsječaka biljnog materijala sorata Babić, Porton i Pinot crni odabran je ½ MS medij, radi pozitivnih iskustava iz ranijih istraživanja.

Za pripremu hranidbene podloge korištene su koncentrirane matične otopine potrebnih elemenata, vitamina i hormona iz *in vitro* laboratorija Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo. Hranidbena podloga je pripremljena prema protokolu prikazanom u tablici 3. Otopine se moraju čuvati u hladnjaku ili u zamrzivaču. Dvostruko destilirana voda odmjerena je menzurom, a svaka matična otopina pojedinačno je dodana automatskom pipetom u posudu koja je predodređena za zagrijavanje otopine. pH podloge prilagođava se prije dodavanja agara. HCl se upotrebljava za smanjenje pH, a NaOH za njegovo povećanje. Elektroda pH-metra stalno je uronjena u podlogu i uz miješanje polako se dokapava lužina i tako regulira vrijednost. Lužina se nastavlja dodavati do vrijednosti pH od 5,8. Dodavanje agara hranidbenoj podlozi služi za ukrućivanje tekuće podloge.

Kada se agar otapa u koncentracijama od 0,6 do 1,0% u vodi, on stvara polukruti gel pogodan za podloge *in vitro*. Za otapanje agara, potrebno je hranidbenu podlogu grijati gotovo do kuhanja. Nakon zagrijavanja do odgovarajuće temperature od oko 98ºC dodaje se agar i miješa dok prozirni komadići potpuno ne nestanu. Ukrućivanje se javlja ponovnim hlađenjem kod oko 40ºC. Zatim je podlogu potrebno razdijeliti u posude dok je još tekuća.

Tablica 3: Protokol za pripremu hranidbene podloge MS s pripadajućim sastojcima i njihovim koncentracijama

Protokol za pripremu MS medija				
	oznaka medija: volumen:		datum: ime kulture:	
redni broj	sastojci	Matična otopina (g u 500 ml)	Konc.	Uzeti za 1l medija
1.	NH_4NO_3	82,50	100x	10 ml
2.	KNO_3	95,00	100x	10 ml
3.	$CaCl_2$ x $2H_2O$	22,00	100x	10 ml
4.	$MgSO_4$ x $7H_2O$	18,50	100x	10 ml
5.	KH_2PO_4	8,50	100x	10 ml
6.	Na_2EDTA	1,86	100x	10 ml
7.	$FeSO_4$ x $7H_2O$	1,39	100x	10 ml
8.	MS mikrosoli		1000x	1 ml
9.	Vitamini	50mg/50ml		
	B1	50mg/50ml	10^{-3}	0,1 ml
	B6	50mg/50ml	10^{-3}	0,5 ml
	nikotinska kiselina	50mg/50ml	10^{-3}	0,5 ml
	glicin	50mg/50ml	10^{-3}	2,0 ml
10.	hormoni citokinini auksini giberelin ostali	25mg/25ml	10^{-3}	dodati prema receptu
	inozitol	100 mg/l		
	saharoza	30 g/l		
	Agar	8 g/l		
	pH 5,8	Početni:		Podešeni:

4.3. Sorte u istraživanju

U istraživanje su uključene tri sorte vinove loze (Babić, Pinot crni i Porton). Za potrebe prijašnjih istraživanja izdanci sorata su sterilizirani i uvedeni u kulturu te su održavani višestrukim multiplikacijama u komori rasta. Biljni materijal uzet je iz *in vitro* laboratorija Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agonomskog fakulteta u Zagrebu te je korišten u ovom istraživanju.

Hrvatska autohtona sorta Babić je glavni materijal istraživanja. Odabrana je s ciljem muliplikacije i stvaranja dovoljne količine biljaka za aklimatizaciju zbog potrebe za dobivanjem zdravog sadnog materijala. Uzorkovanjem proizvodnih nasada i podvrgavanjem uzoraka na ELISA-test, sorta Babić pokazala je zaraženost virusom GLRaV-1 u postotku od 4.08 te GLRaV-3 100% (Vončina, 2009). U sklopu talijanskog projekta "*Valorizzatione, risanamento e produzione di materiale vitivinicolo d'aerea, VARIPROVIT - INTERREG IIIA, Europska unija, Centro di ricerca e Sperimentazione in Agricoltura "Basile Caramia", Locorotondo, Italia, 2004-2007*" nekoliko eksplantanata sorte Babić ozdravljeno je kulturom tkiva i termoterapijom u Italiji i nakon toga vraćeno u Hrvatsku. Nakon provedbe ELISA- testa na Zavodu za fitopatologiju, Agronomskog fakulteta u Zagrebu, potvrđeno je da su uvezenom biljnom materijalu eliminirani svi značajni vinogradarski virusi i kao takav smatra se da je to jedini virus-free biljni materijal ove sorte koji je dostupan za daljnja istraživanja i multiplikaciju.

Uz Babić, za pokus je korišten i biljni materijal sorte Porton koji je ranije uveden u kulturu. Izabran je zbog svoje adaptibilnosti i uspješnog rasta u *in vitro* uvjetima. Također uzet je i materijal sorte Pinot crni s ciljem uključivanja svjetskih sorata u istraživanje.

4.4. Provođenje multiplikacije i mjerenje rasta i razvoja biljaka

Prije početka multipliciranja odabrana je određena količina biljnog materijala navedenih sorata iz dva tipa posuda – "frutke" i epruvete. Frutka je staklena posuda nalik čaši s ravnim dnom zapremnine 175 ml te pripadajućim poklopcem. Zapremnima epruveta je 24 x 140 mm. Korištene su posude proizvođača *SIGMA-Aldrich*.

Biljke sorte Babić uzete su iz frutki i epruveta. Biljke sorte Porton uzete su iz frutki, a Pinota crnog iz epruveta. Svakoj biljci izmjerena je visina i zabilježen broj nodija 8 tjedana od početne sadnje odnosno od posljednje multiplikacije (tablica 4).

Tablica 4: Odabrani biljni materijal za istraživanje

Sorta	**Posude**	**Br. biljaka**
Porton	frutke	29
Babić	epruvete	6
	frutke	32
Pinot crni	epruvete	17

U sljedećem koraku provedena je multiplikacija metodom nodijskih odsječaka. Biljka je uz pomoć laboratorijskog pribora (pinceta, nožić…) izvađena na sterilni papir zbog lakše manipulacije. Očišćena je od hranidbene podloge, korijen i listovi su odstranjeni te je milimetarskim papirom izmjerena visina stabljike. Pup iz pazdušca lista zajedno s 2 do 3 mm stabljike ispod i iznad pupa, tz. nodijski odsječak, je uz pomoć nožića odvojen od biljke te umetnut u hranidbenu podlogu nove posude na ½ MS medij. Sorte Porton i Pinot crni multiplicirane su jednom, a sorta Babić dva puta (tablica 5.) Prilikom provođenja ponovne multiplikacije ponovno je obavljeno mjerenje visine biljke i broja nodija. Sva mjerenja su zbog spriječavanja kontaminacije rađena neposredno prije multiplikacije u sterilnoj atmosferi laminara. Posude u koju su sađeni novi odsječci je evidentirana pod vlastitom šifrom zbog lakšeg daljnjeg praćenja matične biljke i smještena u komoru rasta.

Mjerenje rasta i razvoja biljaka analizirano je statističkim programom SAS 4.3, korištenjem analize ANOVA, za utvrđivanje postojanosti razlika između sorata i posuda, te Duncana testom za utvrđivanje razlika u visini biljke i broju nodija između sorata.

Tablica 5: Broj provedenih multiplikacija

Sorta	1.multiplikacija (posađene u ...)	2.multiplikacija (posađene u ...)
Porton	X (frutke i epruvete)	-
Babić	X (frutke)	X (frutke)
Pinot c.	X (frutke)	-

Rast nodijskih odsječaka nakon provedene multiplikacije je praćen vizualnim opažanjima s glavnim opaskama*: raste, sušenje* i *kontaminacija*. Opažanja su provedena četiri tjedna nakon prve multiplikacije te četiri tjedna nakon druge multiplikacije. Posude označene opaskama *sušenje* i *kontamnacija* su izdvojene iz daljnjeg praćenja.

Multiplikacijski indeks je broj dobiven dijeljenjem broja dobivenih biljaka sa početnim brojem biljaka tijekom *in vitro* multiplikacije. Izračunat je nakon završetka posljednje faze multiplikacije, odnosno kada je procijenjeno da su biljke spremne za aklimatizaciju. Odbačene posude nisu uračunate u ukupan broj dobivenih biljaka.

4.5. Aklimatizacija

Kada se multiplikacijom dobije dovoljno odraslih biljaka koje pokazuju normalan rast, one moraju biti zakorijenjene i prenesene u zemlju. U fazi aklimatizacije biljke se prenose iz posude u zemlju i prilagođavaju se vanjskim uvjetima te se to smatra kritičnim trenutkom za provođenje uspješnog daljnjeg rasta biljke.

Tijekom istraživanja najprije je proveden predpokus da bi se vidjelo kako biljke reagiraju na taj osjetljiv korak. Odabrane su 23 biljke sorte Babić stare 4 do 5 tjedana s dobro razvijenim korijenom i nekoliko većih listova. Sadnja biljaka je započeta 14. travnja 2015., mjesec dana nakon zadnje multiplikacije. Sadnja je provedena u laboratorijskim uvjetima. Nakon otvaranja frutki, biljke su u što kraćem vremenu posađene u supstrat. Frutke su izvađene iz komore na

radnu površinu u laboratoriju. Otvorene su i biljkama je ispran korijen od ostataka hranjivog medija. Korijen je prikraćen na 1 do 2 cm radi lakše sadnje. Za sadnju su korišteni plastični „mini plastenik“ s poklopcem te predhodno sterilizirana smjesa treseta i perlita. Korištena je smjesa *Steckmedium* njemačkog proizvođača *Klasman*. Preporučena je za zakorijenjivanje i razmnožavanje reznica svih vrsta cvijeća i ljekovitog bilja. Smjesa je punjena u *jiffy* posude. Takve posude mogu biti okrugle ili kvadratne u veličine od 4,5 cm² do 6 cm² te su namjenjene za privremenu sadnju biljaka tijekom njihovog rasta. Napravljene su od organskog materijala.



Slika 3. *Jiffy* posude za presadnice, izvor: www.jiffypot.com

Nakon sadnje u *jiffy* posude, biljke i medij temeljito su navlaženi. Posude s 23 biljke su smještene u mini plastenik u klima komori (kontrolirani uvjeti) na 2 dana tijekom kojih je destiliranom vodom vlažen unutarnji dio poklopca kako bi se postigla što viša relativna vlažnost. Nakon komore, mini plastenik je izvađen u uvjete laboratorija i smješten na površinu uz prozor. Sljedećih 14 dana biljke su vlažene tri puta dnevno, a poklopac je bio potpuno zatvoren. Nakon 3 tjedna od sadnje (5.svibnja 2015.) provedeno je opažanje. U sljedećim danima, poklopac je postupno otvaran, a vlaženje je smanjeno na jedanput dnevno. Nakon 8 tjedana od sadnje (10. lipnja 2015.) preživjele biljke su presađene u jogurt čaše (plastična čaša zapremnine 2 dl) uz povremeno vlaženje supstrata, a nakon još 4 tjedna rasta (9. srpnja 2015.) provedeno je završno opažanje.

Pokus je započet 18. svibnja 2015. te su testirani isti uvjeti kao u predpokusu na većem broju biljaka - sađenje u supstrat unutar mini plastenika s poklopcem, orošavanje destiliranom vodom tri puta dnevno tijekom 14 dana te postupno uklanjanje poklopca, bez vlaženja biljke, već samo supstrata. U pokus su uključene biljke sorte Porton stare 4 mjeseca i Babića stare 2 mjeseca. Odabrane su kategorije biljaka: « velike » (više od 3 cm) i « male » (niže od 3 cm) te kod Portona « male » (manje od 3 cm), « velike » (od 3 do 6 cm) i malo starije biljke « iz epruveta » (veće od 6 cm, prvotno razvijene iz somatskih embrija), koje su već djelomično imale lignificirane stabljike u trenutku presađivanja.

Uspjeh aklimatizacije mjeren je utvrđivanjem broja preživjelih u odnosu na posađene nakon 8 tjedana od sadnje te slikama prikazan njihov napredak. Koraci aklimatizacije prikazani su u tablici 6.

Tablica 6: Koraci aklimatizacije

Kratki pregled koraka aklimatizacije
1. Uklanjanje medija s biljke destiliranom vodom
2. Prikraćivanje korijena
3. Smještanje biljke u rupu u *jiffy* posudi
4. Zatrpavanje korijena i rupe dodatkom supstrata
5. Vlaženje supstrata i poklopca
6. Zatvaranje mini plastenika i smještanje u komoru
7. Održavanje visoke relativne vlažnosti tijekom 2 dana
8. Smještanje mini plastenika na dnevno svijetlo u zatvoren prostor
9. Održavanje visoke relativne vlažnosti tijekom sljedećih 14 dana
10. Opažanje
11. Nakon 14 dana polovično otvaranje poklopca i vlaženje jednom dnevno
12. Nakon sljedećih 14 dana potpuno uklanjanje poklopca i vlaženje prema potrebi
13. Nakon zadovoljavajućeg rasta, sadnja u jogurt čaše



Slika 4. Uklanjanje ostatka medija



Slika 5. Prikraćivanje korijena prije sadnje

5. REZULTATI

5.1. *In vitro* kultura vinove loze

In vitro kultura vinove loze u ovom istraživanju obuhvaća multiplikaciju te praćenje rasta inokuliranih nodijskih odsječaka u različitim posudama (epruvetama i frutkama), te utjecaj multipliciranja na dobivanje veće količine materijala te u konačnici aklimatizaciju preživjelih biljaka.

5.1.1. Utjecaj rasta i razvoja inokuliranih nodijskih odsječaka

Mjerenje rasta i razvoja odabranih biljaka provedeno je neposredno prije provođenja multiplikacija. Tablica 7 prikazuje koje su posude izabrane, koji je broj biljaka uzet te njihova prosječna visina i broja nodija. Uspoređen je rast dva tipa posuda kod sorte Babić, dok je Porton posađen u frutke, a Pinot crni u epruvete.

Tablica 7: Utjecaj sorata Babić, Pinot crni i Porton na rasta i razvoja biljaka - početna kultura

Sorta	**Posuda za kulturu**	**Broj biljaka**	**Prosječna visina biljke cm**	**Prosječni broj nodija**
Porton	frutke	29	6,36 b	7,74 b
Babić	epruvete	6	6,08 b	5,00 b
	frutke	32	7,14 b	5,96 b
Pinot c.	epruvete	17	10,85 a	14,24 a
F vrijednost			13,57	15,30
Pr>F			<.0001	<.0001

*srednje vrijednosti kojima su pridružena ista slova nisu signifikantno različite prema Duncanovom testu (P ≤ 0.05) za parameter sorta

Usporedba rasta u različitim posudama (frutke i epruvete) napravljena je na sorti Babić. Prema provedenoj analizi ANOVA, posude nisu imale signifikantan utjecaj na visinu biljke i broj

nodija, dok je sorta imala signifikantan utjecaj na iste parametre. Vrijednosti visina biljaka i broja nodija, najviša je kod sorte Pinot crni sađen u epruvete (10,85 cm, odnosno 14,24 nodija) i značajno se razlikuje u odnosu na ostale sorte. Nisu zabilježene značajne razlike u rastu između sorata Babić i Portan. Iz tablice 7 vidljivo je da je sorta Babić pokazala bolji rast (iako ne statistički značajno) u frutkama nego u epruvetama. Prosječna visina Babića u epruvetama je iznosila 6,08 cm, a u prosjeku je bilo 5 nodija po biljci. U frutkama je njegova prosječna visina bila 7,14 cm, a prosječan broj nodija je 5,96. Najmanji broj nodija i visinu biljke postigao je Babić iz epruveta, pa je dalje sađen u frutke.

5.1.2. Utjecaj sorte i posude za kulturu tkiva na rast i razvoj biljaka nakon multiplikacije

Ovisno o količini raspoloživog materijala svake pojedine sorte, nastojalo se napraviti dovoljan broj multiplikacija da se dobije što ujednačeniji materijal za aklimatizaciju. Ovom prilikom sorta Porton je posađena u različite posude kako bi se utvrdio utjecaj na rast. Također Pinot crni je posađen u frutke.

Tablica 8: Utjecaj sorte i posude za kulturu tkiva na rast i razvoj biljaka nakon multiplikacije

Sorta	**Posuda za kulturu/ broj biljaka za multiplikaciju**	**Broj biljaka dobiven multiplikacijom**	**Prosječna visina biljke cm**	**Prosječni broj nodija**
Porton	epruvete / 7 biljaka	12	8,22 a	7,50 a
Porton	frutke / 22 biljke	36	5,32 b	4,47 b
Babić	frutke / 32 biljke	112	4,86 b	5,30 b
Pinot crni	frutke /17 biljaka	41	2,38 c	4.34 b
F vrijednost			19,43	9,15
Pr>F			<.0001	<.0001

*srednje vrijednosti kojima su pridružena ista slova nisu signifikantno različite prema Duncanovom testu (P ≤ 0.05) za parametre sorta i posuda

Mjerenjem daljnjeg rasta nakon prve multiplikacije, uvidjeli smo da je utjecaj sorte i posude na rast biljaka *in vitro* bio značajan, odnosno vrijednosti visine biljaka i broja nodija se razlikuju među sortama, ovisno o posudama u koje su sađene (Tablica 8). Praćeni parametni kod sorte Porton sađene u epruvete, signifikantno se razlikuju od iste sorte Porton i svih ostalih sorata sađenih u frutke. Dobivene su više biljke Portona (prosjek 8,22 cm) s više nodija (prosjek 7,5) od rasta u frutkama. Najslabiji rast nakon multiplikacija pokazao je Pinot crni. Prosječna visina biljaka bila je 2,38 cm (signifikantno niža od ostalih sorata), a prosječan broj nodija po biljci 4.34 (signifikantno niže samo u odnosu na sortu Porton u epruvetama). Ostvareni signifikantno bolji rast u epruvetama sorte Porton može se pokazati prednošću u kasnijim koracima aklimatizacije.

5.1.3. Gubitak materijala tijekom multipliciranja *in vitro*

Zbog propusta prilikom multiplikacije ili sterilizacije hranidbene podloge, na nekim posudama pokazali su se znakovi kontaminacije mikroorganizmima. One su odbačene, a njihov sadržaj je zbrinut s oprezom radi spriječavanja dodatnih zaraza i širenja spora unutar prostora laboratorija i laboratorijske opreme. Sa povećanom prevencijom nastanka kontaminacije smanjio bi se broj odbačenih biljaka i tako povećao multiplikacijski indeks. Sušenje biljaka nakon multiplikacije i tijekom rasta *in vitro* može biti uzrokovano lošom recepturom hranidbene podloge. U slučaju ovog istraživanja, pretpostavlja se da su internodiji na nodijskim odsječcima bili premali (uziman eksplantant sa samoj jednim nodijem) pa nisu mogli započeti rast zbog nedostatka energije ili su bili loše postavljeni na hranidbenu podlogu. Kontaminirane posude i posude sa suhim biljkama kod svake sorte prikazane su u tablici 9.

Tablica 9: Prikaz kontaminacije i sušenja biljaka tijekom istraživanja

Sorta		Broj posuda nakon multiplikacija	Broj posuda sa sušenjem eksplantata	Broj kontaminiranih posuda	Ukupno odbačeno posuda %	Dodatno izgubljene biljke
Babić	1.multiplikacija	61	15	8	37.7%	37
	2. multiplikacija	153	75	4	51.6%	-
Pinot crni		41	14	5	46.3%	57
Porton		47	11	0	23.4%	-
Ukupno		**302**	**115**	**13**	**42.3%**	**94**

Nakon provedenih multiplikacija, izgubljeno je 42.3 % biljnog materijala zbog kontaminacije i sušenja.

Kod sorte Babić tijekom prvog opažanja odbačeno je 15 suhih i 8 kontaminiranih posuda, ukupno 37.7 % biljnog materijala. Nakon provedene druge multiplikacije i opažanja, odbačeno je 75 suhih i 4 kontaminirane posude (51.6%). Sorta Pinot crni prilikom prvog opažanja imala je 14 posuda sa suhim biljkama i 5 kontaminiranih posuda (46.3%), a sorta Porton 11 posuda koje nisu pokazale rast, tj. sušenje (23.4%). Kontaminacija kod ove sorte nije zapažena.

Neposredno prije provođenja aklimatizacije utvrđeno je sušenje još 37 pojedinačnih biljaka kod Babića i 57 biljaka kod Pinota crnog, ukupno 94 biljaka.



Slika 6. Pinot crni – uspješna (lijevo) i neuspješna (desno) multiplikacija

5.1.3. Određivanje multiplikacijskog indeksa

Nakon što je provedena multiplikacija biljaka i odbačene posude kod kojih je utvrđeno sušenje ili kontaminacija, preživjele biljke su prebrojene s ciljem utvrđivanja multiplikacijskog indeksa. Broj dobivenih biljaka podijeljen je s brojem biljaka nakon provođenja multiplikacija (Tablica 10).

Tablica 10: Multiplikacijski indeks sorata u istraživanju

		broj biljaka			**multiplikacijski indeks**		
sorta	**posuda za kulturu**	**početna kultura**	**1. multipl.**	**2. multipl.**	**1. multipl.**	**2. multipl.**	**ukupno**
Porton	epruvete	7	12	-	1,71	-	**1,71**
	frutke	22	36	-	1,64	-	**1,64**
Babić	frutke	38	112	99	2,95	0,88	**2,61**
Pinot c.	frutke	17	41	-	2,41	-	**2,41**

Najviši multiplikacijski indeks je zabilježen kod sorte Babić (2.61), a najmanji kod sorte Porton (1,65). Kod sorte Porton, usporedbom posuda utvrđen je veći multiplikacijski indeks kod biljaka koje su rasle u epruvetama. Sorta Babić dala je loš rezultat nakon druge multiplikacije, kada je nakon izbačene kontaminiranih i osušenih posuda, dobiveno manje biljaka nego što ih je bilo prije multiplikacije.



Slika 7 i 8. Multiplikacija sorte Babić – biljni materijal u frutkama

5.2. Utjecaj procesa aklimatizacije biljaka na rast i razvoj biljaka nakon iznošenja iz *in vitro* uvjeta

Dio istraživanja koji se odnosio na aklimatizaciju podijeljen je na dva dijela: predpokus i pokus. Predpokusom su na manjem broju biljaka ispitani koraci koji će kasnije u pokusu biti primjenjeni na veći broj biljaka. Za aklimatizaciju su korištene sorte Babić i Porton.

5.2.1. Predpokus aklimatizacije

Predpokus je proveden sa 2 mjeseca starim biljkama Babića iz *in vitro* uvjeta da bi se vidjelo kako biljke reagiraju na taj kritičan trenutak.

Posađeno su 23 biljke sorte Babić u *jiffy* posude unutar mini plastenika. Nakon 3 tjedna opažanjem je utvrđeno da su se biljke u jednoj *jiffy* posudi potpuno osušile, njih ukupno 12, a u drugoj *jiffy* posudi osušilo se 4, a preživjelo je 7 biljaka. One su pokazale stagnaciju s rastom nakon sadnje. Četiri tjedna od provedenog opažanja, odnosno 7 tjedana od sadnje u *jiffy* posude preživjele biljke su presađene u jogurt čaše. Kao završni korak predpokusa obavljeno je opažanje 11 tjedana nakon započete aklimatizacije kojim je utvrđeno sušenje 2 biljke. Na kraju provedenog predpokusa preživjelo je ukupno 5 biljaka.



Slika 9. Biljke na aklimatizaciji - dva tjedna nakon sadnje (29. travnja 2015.)

Nakon sadnje, *ex vitro* uvjeti počeli su utjecati na biljke. Iako je sadnja obavljena u što kraćem vremenskom roku, biljke su počele klonuti. Tijekom dva dana u komori i oko dva tjedna u uvjetima laboratorija većina listova se osušila i stanje je stagniralo. Nakon tri tjedna opažanjem je utvrđeno da su biljke odbacile listove stvorene u *in vitro* uvjetima i započele apikalni rast i stvaranje novih listova (slika 9). U ovoj fazi posušilo se 12 biljaka.

Nakon 7 tjedana biljke su presađene u plastične čašice (slika 10). Tada dolazi do dodatnog sušenja te pojave plijesni na biljkama i površini supstrata. Od ukupno 23 biljke s kojima je postavljen predpokus, nakon nešto manje od 3 mjeseca preživjelo ih je samo 5 ili 21,7 %.



Slika 10. Biljke presađene u plastične čašice 7 tjedana nakon početka aklimatizacije

5.2.2. Pokus aklimatizacije

U pokus su uključene biljke sorte Porton stare 4 mjeseca i biljke Babića stare 6 mjeseci. Biljke su podijeljene u nekoliko kategorija prema visini. Porton u tri kategorije: “male” (biljke niže od 3 cm), “velike” (biljke visoke od 3 do 6 cm) i “iz epruvete” (biljke koje su rasle u epuvetama i postigle rast viši od 6 cm), a Babića u dvije: “male” (biljke niže od 3 cm) i “velike” (biljke više od 3 cm). Tijekom pokusa praćene su promjene na biljakama te je utvrđen broj preživjelih biljaka (Tablica 11). Zbog pojavljivanja plijesni u predpokusu, u pokusu je nakon sadnje biljaka u plastične čaše izbjegavano vlaženje cijele biljke već samo supstrata.

Tablica 11: Utjecaj sorte i veličine biljaka stavljenih na aklimatizaciju na preživljavanje – osam tjedana nakon sadnje

Sorta	**kategorija**	**broj posađenih biljaka**	**broj preživjelih biljaka**	**% preživljavanja**
Porton	*male*	11	2	**18.18%**
Porton	*velike*	24	12	**50%**
Porton	*iz epruvete*	12	9	**75%**
Babić	*male*	36	2	**5%**
Babić	*velike*	33	11	**33,33%**

Biljke sorte Babić kategorije "male" su imale postotak od 5%, a "velike" 33,33% preživjelih biljaka od ukupno posađenih. Biljke sorte Porton "iz epruvete" dale su najbolje rezultate prilikom aklimatizacije te sorte sa 75% preživjelih nakon 8 tjedana od sadnje.

Kao i kod biljaka u predpokusu, nakon prijenosa u *ex vitro* uvjete i sadnje u supstrat dolazi do sušenja listova te ponovnog formiranja iz bazalnih ili rijeđe iz nekih viših pupova.



Slika 11. i 12. Sušenje starih listova i rast novih mladih listova na biljkama tijekom aklimatizacije

Biljke sorte Babić kategorije “male” su imale postotak od 5%, a “velike” 33,33% preživjelih biljaka od ukupno posađenih (slika 13). Biljke sorte Porton iz epruveta dale su najbolje rezultate prilikom aklimatizacije te sorte sa 75% preživjelih nakon 8 tjedana od sadnje.



Slika 13. Dvije preživjele biljke tijekom pokusa aklimatizacije

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja možemo zaključiti:

1. Sorta ima značajan utjecaj na rast i razvoj u kulturi nodijskih odsječaka *in vitro,* kako u fazi početne kulture tako i pri multiplikaciji. Izbor posude nije značajno utjecao na rast u početnoj kulturi, no visina i broj novostvorenih nodija značajno su se razlikovale ovisno o odabranoj posudi za kulturu tkiva.

2. Sorta Pinot crni najbrže je rasla u kulturi *in vitro* te su biljčice prije 1. multiplikacije postigle prosječnu visinu od 10,85 cm i razvile 14,24 nodija.

3. Nakon provedena dva ciklusa multiplikacije, najviši multiplikacijski indeks utvrđen je kod sorte Babić (2.61), a najmanji kod sorte Porton (1,65).

4. Postignut nizak multiplikacijski indeks u velikoj je mjeri posljedica gubitka velikog broja kultura zbog pojave sušenja biljčica i kontaminacije kultura. Ovi su gubitci uzrokovani nedostatkom vještine u provođenju postupaka *in vitro.*

5. U predpokusu aklimatizacija, od 23 biljake sorte Babić nakon 11 tjedana u *ex vitro* uvjetima preživjelo je njih 5 ili 21,7%.

6. Sorta i veličina biljaka utjecala je na stopu preživljavanja u postupku aklimatizacije. Sorta Porton imala je postotak preživljavanja od 18,8 – 75%, a sorata Babić 5 - 33,33%. Biljake sorte Porton više od 6 cm rasle prije aklimatizacije u epruveti, najbolje su podnijele postupak aklimatizacije te je nakon 8 tjedana preživjelo njih 75%. I kod sorte Babić veće su biljke imale viši postotatk preživljavanja (33.33%), dok je manjih biljaka (<3 cm) preživjelo svega 5%.

7. Nakon prijenosa biljaka u *ex vitro* uvjete i sadnje u supstrat treba očekivati sušenje listova te kroz nekoliko dana ponovno formiranje iz bazalnih ili rjeđe iz nekih viših pupova.

8. Sorte Babić i Porton uspješno su aklimatizirane na *ex vivo* uvjete, no udio biljaka koje prežive ovaj postupak nije dostatno velik za širu primjenu. Istraživanja je potrebno nastaviti s ciljem optimizacije svih koraka aklimatizacije.

7. LITERATURA

Aazami, M. A. 2010. Effect of some growth regulators on "*in vitro*" culture of two *Vitis vinifera L.* cultivars. Romanian Biotechological Letters. 15:3

Barlass M., Skene K. G. M. 1978. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. Vitis. 17:335-340

Barlass, M., Skene, K. G. M. 1980. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II factors affecting growth and differentiation *in vitro*. J. Exp. Bot. 31:489-495

Beauchesne, G. 1982. Appearance of plants not true to type during *in vitro* plant propagation. Objavljeno u: Earle E. D., Demarly Y. (ur.): Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger, New York. 268-272.

Bigger, Brant B. 2010. Micropropagation and acclimatization of "Norton" grapevine (*Vitis aestivalis*) Theses, Dissertations, and Student Research in Agronomy and Horticulture. 16.

Chee R., Pool R.M. 1982. The effect of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of Vitis cultured *in vitro*. Scientia Hort. 16:17-27

Chee, R., Pool, R.M, Bucher, D. 1984. A method for large scale *in vitro* propagation of Vitis. New York´s Food and Life Sciences Bulletion 109: 1-9

Faulks L., Mudge K.W. 1988. Optimization of environmental conditions of stage IV micropropagated grapes. HortScience 23:101

Harris, R. E., Stevenson, J. H. 1982. *In vitro* propagation of *Vitis*. Vitis 21:22-32

Hartl, D., Maleš P. 2000. Factors affecting grapevine cultivars Vugava and Plavac mali micropropagation from *in vitro* cultured minicuttings. Biologija, Bratislava 55/1:121-129

Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Science Vol. 85, 12: 1704-1710

Heloir, C., Fournioux J., Oziol L., Bessis R. 1997. An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera cv.* Pinot noir) using axillary-bud microcuttings, Demarly. Praeger publication, New York. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 49, 3:223-225

Hocquigny S., Pelsy F., Dumas V., Kindt S., Heloir M.C., Merdinoglu D. 2004. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states Genome. 47:579–589

Jelaska S. 1994. Kultura biljnih stanica i tkiva. Školska knjiga, Zagreb.

Karoglan Kontić J., Preiner D., Šimon S., Zdunić G., Poljuha D., Maletić E. 2009. Sanitary status of Croatian native grapevine varieties. Agriculturae Conspectus Scientifi cus 74(2) : 1-5

Lacombe T, Audeguin L, Boselli M. 2011. Grapevine European Catalogue: towards a comprehensive list. Vitis 50:65–68

Lakso A. N., Reisch B. I., Mortensen J., Roberts M. H. 1986. Carbon enrichment for stimulation of growth of *in vitro*-propagated grapevines after transfer from culture. J.Amer.Soc.Hort.Sci. 111: 634-638

Lewandowski V.T. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated grapes. HortScience 26:586-589

Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. 2008. Vinova loza. Školska knjiga, Zagreb

Marković Z., Preiner D., Bošnjak A. M., Safner T., Stupić D., Andabaka Ž., Maletić E., Chatelet P., Engelmann F., Karoglan Kontić J. 2014. *In vitro* introduction of healthy and virus-infected genotypes of native Croatian grapevine cultivars. Cent. Eur. J. Biol. 9(11): 1087-1098

Martelli, G.P. 1993. Graft-transmissible diseases of grapevine, Handbook for detection and diagnosis. ICVG, Rome

Martelli, G. P. 2009. Grapevine virology highlights 2006 - 2009. Extended abstracts of the 16th Meeting of ICVG. Dijon Le Progres Agricole et Viticole. Hors Série Spécial Congrés ICVG. 15-24

Mirošević N., Karoglan Kontić J. 2008. Vinogradarstvo. Nakladni zavod Globus, Zagreb

Mohammed G. H., Vidaver W. E. 1990. The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse preformance of tissue cultured Douglas fir (Pseudotsunga menziedsii Mixb. Franco. Plant Cell Tissue Organ Cult. 21:111-117.

Morel G. 1944. Le development de Mildiou sur des tissue de vigne cultives *in vitro*. C.R. Hebd Seances Academie des sciences 218:50-52

Morini, S., Marzialetti, P., Barbieri, C. 1985. *In vitro* propagation of grapevine, Riv. Ortoflorofrutt. Ital., 69

Mullins M. G., Srinivasan C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (*cv.* Cabernet sauvignon) by apomixes *in vitro*. J.Exp.Bot. 27:1022- 1030

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A rivised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473:497

Nasr El-Din i sur. 1997. Bull Fac Agric Kairo Univ 48: 129-42

Novak, F.J. i Juvova Z. 1982. Clonal propagination of grapevine through *in vitro* axillary bud culture, Scientia Hort.18

Karoglan Kontić J., Maletić E., Ozimec R., Matotan Z., Strikić F. 2015. Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije. Program Ujedinjenih naroda za razvoj.

Pejić I., Maletić E. 2010. Conservation, evaluation and revitalization of native grapevine varieties in Croatia. Mittelungen Klosterneuburg 60 (3): 363-368.

Pelsy F. 2010. Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties Heredity 104: 331–340

Pospišilova, J., Ticha, I., Kadleček P., Haisel D., Plzakova Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biologia Plantarum 42 (4): 481-497

Raymond C., Pool R. M., Bucher D. 1984. A method for large scale *in vitro* propagation of Vitis. New York's food and life science. Bul. 119: 1-9

Read P.E. 2007. Micropropagation: Past Present and Future: Acta Horticulture 748:17-27

Robinson J. 2003. Jancis Robinson's Wine Course Third Edition Abbeville Press, New York. 148

Roubelakis-Angelakis K. A. 2010. Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology. Springer New York.

Santana J.C., Hidalgo E., Lucas A.I. de; Recio P., Ortiz J.M., Martin J.P., Yuste J., Arranz C., Rubio J.A. 2008. Identification and relationships of accessions grown in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) Germplasm Bank of Casstilla y Leon (Spain) and the varieties authorized in the

VQPRD areas of the region by SSR-marker analysis. Genetic Resources and Crop Evolution. 55:573-583

Seelye J. F., Burge G. K., Morgan E. R. 2003. Acclimatizing Tissue Culture Plants: Reducing the Shock. New Zealand

Silva R .d. C., Luis Z. G., Scherwinski-Pereira J. E. 2012. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes, Pesq.agropec.bras., Brasilia. 47(3): 344-350

Singh A. 2015. Plant Biology and Biotechnology, Springer India. 201: 329-346

Sudarsono R., Goldy R. G. 1988. Effect of some growth regulators on *in vitro* culture of three *Vitis rotundifolia* cultivars. HortScience. 23:757

Swartz H. J., Lindstrom J. T. 1986. Small fruit and grape tissue culture from 1980 to 1985: Commercialization of the techniques; R.H.Zimmerman, R.J. Griesbach, F.a. Hammerschlag, R.H.Lawson (ur.) Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands. 201-220

Thomas P., Schiefelbein J. W. 2001. Combined *in vitro* and in vivo propagation for rapid multiplication of grapevine cv. Arka Neelamani, HortiScience. 36(6): 1107-1110

Thorpe T.A. 2007. History of plant tissue culture. Mol Biotechnol. 37(2):169-80.

Torregrosa L., Bouquet A., Goussard P.G. 2001. *In vitro* culture and propagation of grapevine. Objavljeno u: Roubelakis- Angelakis, K. (ur.): Molecular biology and biotechnology of grapevine. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam. 195-240

Torregrosa L., Iocco P., Thomas M. R. 2002. Influence of Agrobacterium Strain, Culture Medium, and Cultivar on the Transformation Efficiency of *Vitis vinifera* L., Am. J. Enol. Vitic. 53(3) :183-190

Torres-Viñals M., Sabaté-Casaseca S., Aktouche N., Grenan S., Lopez G., Porta-Falguera G., Torregrosa L. 2004. Large-scale production of somatic embryos as a source of hypocotyl for *Vitis vinifera* micrografting. Vitis 43 (4) :163–168

Viala P., Vermorel V. 1909. Ampélographie. Masson et Cie, Paris

Vončina D., Dermic E., Cvjetkovic B., Maletic E., Pejic I., Karoglan Kontic J. 2009. Occurrence of grapevine leafroll-associated virus-1 and 3 in Croatian autochthonous grapevine varieties from Dalmatia. Progrès Agricole et Viticole, Hors Série – Extended abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, France, 31 Aug – 4 Sept 2009

Walter B., Martelli G. P. 1997. Clonal and sanitary selection ofthe grapevine. Objavljeno u: B. Walter (ur.) Sanitary Selection of theGrapevine. Protocols for Detection of Viruses and ViruslikeDiseases. Les Colloques, INRAEditions, Paris, France. 86:43-95

Wang Q.C., Valkonen J.P.T. 2008. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. Trends in Plant.Sci. 14:119-122.

Yerbolova L.S., Ryabushkina N. A., Oleichenko S. N., Kampitova G. A., Galiakparov N. N. 2013. The effect of growth regulators on *in vitro* culture of some *Vitis vinifera* L. cultivars, World Applied Sciences Journal 23 (1): 76-80

Youssef S. A., Al-Dhaher M. M. A., Shalaby A. A. 2009. Elimination of Grapevine fanleaf virus (GFLV) and grapevine leaf roll-associated virus-1 (GLRaV-1) from infected grapevine plants using meristem tip culture. Int. J. Virol. 5: 89-99.

Internetske stranice:

Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju. www.apprrr.hr pristupljeno 20.3.2016.

http://iv.ucdavis.edu/files/24351.pdf pristupljeno 4.prosinca 2015.

http://www.klasmann-deilmann.com/en/ pristupljeno 9. prosinca 2015.

Porton - Vitis Internacional Variety Cataloque http://www.vivc.de pristupljeno 4. prosinca 2015.

8. Životopis

Antonija Car rođena je 20. siječnja 1992. godine. Srednju školu završava pri Srednjoj školi Duga Resa, smjer opća gimnazija i 2010. godine upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, studij Hortikulture usmjerenja Vinogradarstvo i vinarstvo gdje završava preddiplomski i diplomski studij. Obaveznu stručnu praksu obavila je u francuskim vinarijama uspostavljenu s fakultetom "Ecole Supérieure d'Agriculture d'Angers" u Angersu. Tijekom srpnja 2012. u vinariji "Domaine de la Cotellerai", Saint Nicolas de Bourgueil, u regiji Loire upoznala se sa provođenjem zahvata defolijacije i *barrique* tehnikom dozrijevanja vina. Sljedeće godine stručnu praksu obavlja u vinariji ″Château de Cranne", Donzac, u regiji Bordeaux, s naglaskom na specifičnosti kod proizvodnje slatkih vina tipa Sauternes. Pri povratku u Hrvatsku uključuje se u rad Ampelografske grupe koja djeluje u sklopu Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo. S timom sačinjenim od studenta i asistenata sudjelovala je u berbama, preradi grožđa i kemijskim analizama mošta. Tijekom 2014. godine studentski posao obavlja u vinoteci "Dobra vina" u Zagrebu, završava A1 stupanj francuskog jezika te 2. stupanj edukacije WSET (Wine and spirit education trust). Godine 2015. započinje studenski posao u vinariji Saints Hills na Pelješcu.