

Zvezdana Marković, Preiner, D.¹

pregledni rad

Biotehnologija u vinogradarstvu

Sažetak

Posljednjih se godina sve više radi na poboljšanju kulture biljnih stanica i tkiva, na usavršavanju postojećih metoda u svrhu genetskog poboljšanja vinove loze (brže selekcije i oplemenjivanja), ozdravljanja od virusa i brzog klonskog razmnožavanja. Tehnika mikropropagacije *Vitis* vrsta i sorata *Vitis vinifera* dobro je razrađena, a najviše korištena metoda za mikropropagaciju vinove loze je metoda nodijskih segmenata. Sve više pažnje se posvećuje dobivanju virus-free biljaka, a biljke ozdravljene od virusa mogu se dobiti kulturom meristema, uz primjenu termoterapije ili bez nje. Dobre je rezultate dalo i mikrocijepljenje, a u novije vrijeme i metoda krioprezervacije, te kombiniranje dviju spomenutih metoda. Međutim, da bi kultura tkiva i organa mogla značajnije utjecati na genetsko unapređenje vinove loze, potrebno je detaljno definirati protokole svake od tehnika za vinovu lozu.

Glavne riječi: *Vitis vinifera*, kultura tkiva i stanica, mikropropagacija, genetsko unapređenje

Uvod

Definicija koju navodi Europska unija (1992.), a koju je sastavio OECD (Organisation of Economic Co-operation and Development), navodi da je biotehnologija primjena znanosti na živućim organizmima i njihovim dijelovima, proizvodima i modelima s ciljem mijenjanja živućih ili neživućih materijala za stjecanje znanja, proizvodnju dobara i pružanje usluga. Ta je definicija nadopunjena 2005.g. listom biotehnologija koje se primjenjuju na DNA i RNA, proteinima i drugim molekulama, kulturama stanica i tkiva, inženjerstvu, procesima biotehnoških tehnika, genetskim i RN vektorima, bioinformatičari i nanobiotehnologiji.

Konvencija o biološkoj raznolikosti (CBD) definira biotehnologiju kao bilo koju tehnološku primjenu koja koristi biološke sustave, žive organizme ili derivate s ciljem stvaranja ili mijenjanja proizvoda ili procesa za specifičnu upotrebu.

Agrobiotehnologija podrazumijeva modernu biotehnologiju primijenjenu na mnoge načine u agronomiji, šumarstvu, hortikulturi i ribarstvu. Izravna primjena biotehnologije koristi se za uzgoj i razmnožavanje biljaka i životinja, a neizravna primjena očituje se kroz proizvodnju hranidbenih aditiva za životinje, u veterini, farmaciji i dijagnostici. Biotehnologija se također koristi za proizvodnju enzima korištenih u proizvodnji hrane, praćenje njenih sastojaka i osiguranju ispravnosti hrane.

Pozitivni su učinci agrobiotehnologije u biljnoj proizvodnji: usjevi otporni na bolesti i nametnike, povećani prirodni prinos, smanjeni troškovi proizvodnje, brza proizvodnja sadnog materijala i proizvodnja većih količina sadnog materijala u kratkom vremenskom razdoblju, metode ozdravljenja od virusnih bolesti, poboljšanje kakvoće plodova.

Upotreba riječi biotehnologija najčešće se odnosi na genetski inženjering i uzgajanje kultura stanica i tkiva pa se brojne primjene biljne biotehnologije mogu uvjetno podijeliti u dvije velike skupine: kulture tkiva i molekularnu biologiju.

Vinova loza kao kultura od svjetskog interesa uvjetovala je uvođenje spomenutih metoda u vinogradarsku industriju. Osim metoda molekularne biologije u utvrđivanju genetičke stabilnosti ispitivanog materijala te komercijalne primjene kulture tkiva u proizvodnji cjepova vinove loze, sve se više pridaje pažnja dugoročnoj pohrani vinove loze te metodama kojima je moguće eliminirati viruse, kao što su termoterapija i krioterapija. Cilj je ovog rada dati pregled biotehnoških metoda koje su našle svoju praktičnu ulogu u vinogradarskoj proizvodnji.

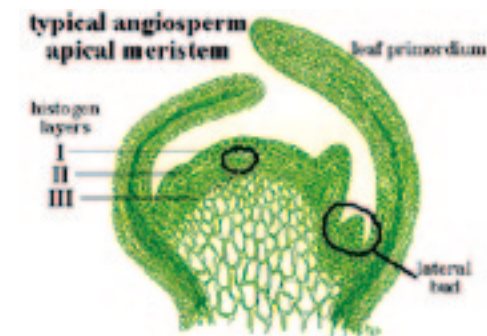
Kultura biljnih stanica i tkiva

Kultura biljnog tkiva postala je sastavni dio istraživanja oplemenjivanja poljoprivrednih, hortikulturalnih i drvenastih biljaka i važan je dio biljne biotehnologije.

Kultura tkiva obuhvaća metode regeneracijecijelih biljaka iz pojedinačnih stanica ili tkiva, koja se zasniva na konceptu „stanične totipotentnosti“ koji je dokazan 1958. Totipotentnost je svojstvo stanice da zadržava mogućnost stvaranja svih tipova stanica odraslog organizma, da regenerira potpunu biljku. Totipotentnost stanica omogućuje dobivanje golemih populacija jednakih stanica koje se masovno mogu diferencirati u korijen, izdanak ili embrionalnu strukturu.

Njemački biolozi Schleiden i Schwann 1838.g. prvi su svojom „staničnom teorijom“ pokušali objasniti totipotentnost diferenciranih stanica, ideju koja nije bila poznata biolozima i koja je otvorila mnoge nove putove razvoja biologije.

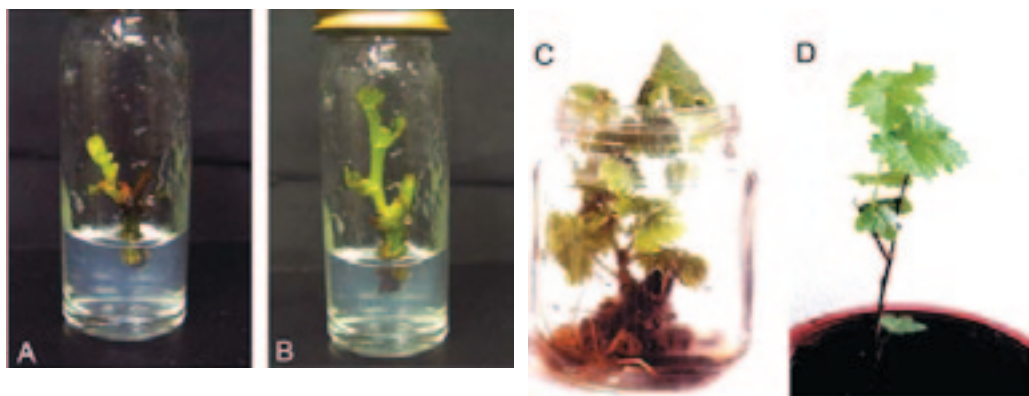
Prvi je pokušaj provedbe tehnike kulture biljnih tkiva bio 1902. g., zatim je 1934.g. bio prvi uspjeh kulture tkiva, a 1946.g. dobivena je prva kompletna biljka iz kulture vegetacijskog vrška (Ball). Razvoj metoda kulture tkiva vezan je uz otkriće regulatora rasta tijekom 30-tih godina 20. stoljeća. Dvadesetak godina kasnije otkriveno je da hormoni citokinini i auksini pomiješani u određenim omjerima mogu stimulirati diferencijaciju biljnih organa iz neorganiziranih staničnih linija (kalusa). Na navedenim se otkrićima razvila cijela



¹ Zvezdana Marković, Darko Preiner, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb, (e-mail: zmarkovic@agr.hr)

industrija in-vitro uzgoja sadnica. Ta tehnika mikrorazmnožavanja nije samo unaprijedila brzinu proizvodnje genetski uniformnog sadnog materijala, već je postala i tehnika za eliminaciju virusa iz zaraženih tkiva i metoda racionalnog održavanja ugroženih biljnih izvora.

Tehnike kulture biljnih tkiva i stanica jedno je od glavnih oruđa u istraživanju problema temeljnih i primijenjenih botaničkih znanosti. Razmnožavanje kulturom tkiva je postupak i osniva se na iskorištavanju rasta sitnih biljnih organa ili komadića tkiva u aseptičnim uvjetima.



Osnovna oprema potrebna za provedbu kultura biljnih stanica i tkiva

Osnovna oprema koja se koristi za uzgoj in-vitro biljaka je oprema za pripremu hranidbene podloge, oprema za sterilno rukovanje biljnim materijalom, opća laboratorijska oprema (sušionik-sterilizator), klima-komora i staklenik.

Razmnožavanje in-vitro biljaka (mikrorazmnožavanje)

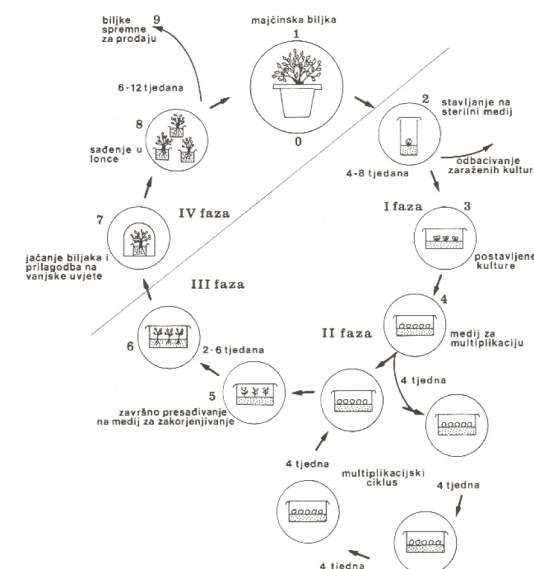
Stvaranje biljaka in-vitro jedan je od najvažnijih ciljeva kulture tkiva koji ujedinjuje znanje u razvoju biljnog organizma s do sada razvijenim tehnikama. Primjena tehnike kulture tkiva in-vitro u rješavanju problema poljoprivrede i znanosti dramatično je povećana posljednjih 20-25 godina. U početku je tržišna tehnologija in-vitro bila uglavnom namijenjena u stvaranju ukrasnih biljaka, a danas se proširila na mnoštvo biljnih vrsta koje se proizvode u matičnim nasadima i onih koje se kloniraju za potrebe poljoprivrede i šumarstva.

Najjednostavniji dio kulture biljnog tkiva je mikrorazmnožavanje. Da bi se ta metoda mogla koristiti, potrebno je poznavati djelovanje uvjeta kultiviranja te poteškoća povezanih sa njime i način izbjegavanja nastalih poteškoća. Te se kulture drže u staklenim ili prozirnim plastičnim posudama. Postupkom vegetativnog razmnožavanja in-vitro dobivamo minijature izdanke i biljčice mnogo brže od tradicionalnih metoda. Neke od tehnika mikrorazmnožavanja mogu biti primjenjive na velikom broju biljnih vrsta (kultura meristema), dok su neke druge tehnike ograničene na mali broj biljnih vrsta. Tržišno se isko-

rištavanje tih tehnika in-vitro ogleda: u dobivanju biljaka bez patogenih klica, posebno virusa; u čuvanju zdravih matičnih biljaka; u poticanju genetskih promjena i poticanju genetičkog inženjerstva te u proizvodnji i izdavanju vrijednih bioloških proizvoda koji se upotrebljavaju u biološkim reaktorima. Od postojećih tehnika kulture biljnog tkiva i stanica, kloniranje (mikrorazmnožavanje) biljaka postiglo je do danas najširu primjenu. Tehnika mikrorazmnožavanja ima veliki faktor multiplikacije, ali može biti praćena pojavom genetske varijabilnosti u potomstvu. Ako se za razmnožavanje koristi tkivo aksilarnih izboja koji su izrasli iz aksilarnih pupova, genetska stabilnost je dobra.

Opći plan mikrorazmnožavanja

Nulta se faza odnosi na postupke prije kulture, tj. pravilan postupak s početnim materijalom, njegovo čuvanje u zdravom stanju. Slijedi I. faza, uvođenje u kulturu, a odnosi se na izolaciju eksplantata (dijela biljke koji se uzima za daljnju reprodukciju). Zatim slijedi II. faza koju označava umnožavanje ili reprodukcija. Glavna je svrha te faze postići razmnožavanje bez gubitka genetičke stabilnosti. III. Je faza priprema kultura za prijenos dobivenih biljčica u zemlju. Ta faza uključuje zastavljanje stvaranja aksilarnih izdanaka ili početak izduživanja izdanaka i poticanje stvaranja korijena. Posljednja IV. faza je sam prijenos biljaka u zemlju, tj. njihova aklimatizacija na rast u vanjskim uvjetima.



Utjecaj biljnog materijala na rast u uvjetima in-vitro

Genotip kao jedan od čimbenika utječe na regeneraciju, općenito se dvosupnice regeneriraju bolje od jednosupnica, što znači da vinova loza ima dobru sposobnost regeneracije. Starost biljke isto je tako važna jer mlada embrijska tkiva obično imaju visoki kapacitet regeneracije s obzirom na tkiva uzeta sa starijih biljaka. Katkada nakon serije supkultura, meristem može postupno poprimiti juvenilne karakteristike, što se naziva „pomlađivanje“, a rezultira porastom učestalosti staničnih dioba. Sposobnost se pomlađivanja može postići kulturom meristema, reznicama, cijepljenjem meristema na mladu podlogu. Vinova loza pripada grupi biljaka kod kojih je moguće pomlađivanje. Mlado i neodrvnjelo tkivo općenito je prikladnije za kulturu od starog drvenastog tkiva. Dijelovi uzeti s biljke koja je u vegetativnoj fazi regeneriraju se bolje i spremnije od dijelova uzetih s biljke u cvatu. Fiziološko se stanje (vegetativno/generativno) može promijeniti umjetnim načinom, tj. tretiranjem biljke regulatorima rasta. Zdravstveni je status biljke također bitan jer snažna i zdrava biljka u trenutku uzimanja eksplantata daje uspješniju kulturu.

Sterilizacija biljnog materijala

Svi postupci u kulturi in-vitro moraju se odvijati u strogo sterilnim uvjetima. Mikroorganizmi koji onečišćuju kulture biljnog tkiva uključuju viruse, bakterije, kvasce i gljivice. Tkivo vinove loze od kojeg će biti uzet eksplantant uranja se u 70% etanol na 30 sekundi, zatim u otopinu 1% natrij-hipoklorita koja sadrži 0,2% polisorbata 80 ili u kalcij-hipoklorit. Slijedi izlaganje materijala vibracijama i centrifugalnoj sili u roto-vibracijskom uređaju na 50 (rpm) okretaja u minuti, na 20 minuta. Sterilizacija se također može izvršiti temeljnim pranjem eksplantanta sapunom i steriliziranim vodom, nakon čega se uranja u 0,1% otopinu živinog-diklorida na 10 minuta, a zatim slijedi ispiranje sterilnom vodom 4-5 puta i brisanje.

Izolacija eksplantanta, inokulacija tkiva i supkultiviranje

Sterilizirani i vodom isprani eksplantanti polažu se na slojeve sterilnog filtarskog papira ili na staklenu površinu sterilnim pincetama. Za kalibriranje veličine i volumena tkiva upotrebljava se milimetarski papir, sterilni bušaći čepova ili se tkivo važe. Prenošenje eksplantanta na hranidbenu podlogu zove se inokulacija. Eksplantanti se inokuliraju pomoću „eze“. Eksplantanti zadržavaju svoju polarnost, što znači da gornja strana eksplantanta najčešće mora biti i gornja strana u kulturi. Supkultiviranje je prenošenje kultura na drugu podlogu, npr. zbog istrošenosti podloge, daljnjeg razmnožavanja i sličnih uzroka.

Hranidbene podloge

Eksplantanti biljaka (dio tkiva ili organ uzet s matične biljke radi daljnje reprodukcije) uzgajaju se in-vitro na umjetno pripremljenim hranjivim podlogama. Dodavanjem potrebnih tvari u odgovarajućem obliku i kombinacijama omogućeno je ostvarivanje kultura gotovo od svakog dijela biljnog tijela. Sve hranjive podloge sadrže mineralne soli (makrohranjiva i mikrohranjiva), ugljikohidrate (najčešće saharoza), vitamine i regulatore rasta (citokinini, auksini). Ako se sumnja da anorganski dodaci (mineralne soli) nisu dovoljni za razvoj kalusnog tkiva, dodaju se još i aminokiseline i drugi organski dodaci. Važno je i da podloga bude određene pH vrijednosti koja odgovara razvoju eksplantanta. Podloge mogu biti tekuće (suspencije) ili čvrste. Preporučljivo je tkivo eksplantanta nasaditi tako da je u čvrstom dodiru s podlogom, no da nije potpuno zaronjeno u podlogu zbog manjka kisika pa se za podloge često koristi agar koji daje čvrstoću. Posude za kultivaciju tkiva mogu biti staklene ili plastične, različitih oblika i veličina: velike epruvete, Petrijeve zdjelice, Erlenmeyerove tikvice, plastične vrećice. Posude se prilikom kultivacije in-vitro zatvaraju čepovima od različitih materijala (pamuk, aluminijska folija, polipropilenski čepovi) kako ne bi došlo do zračne kontaminacije. Podloge su većinom standardizirane, a prilagođavaju se prema svakoj vrsti, sorti i namjeni. Za in-vitro uzgoj vinove loze tehnikom mikropropagacije nodijskim segmentima koriste se podloge: NN za inicijaciju rasta kalusa, WPM za multiplikaciju kalusa, MS za rast izdanka i MS za ukorjenjivanje izdanka. Optimalni pH podloge ovisi o metodi mikrorazmnožavanja i o sastavu podloge i vrlo je bitan, a najčešće se kalibrira na 5.7 do 5.8.

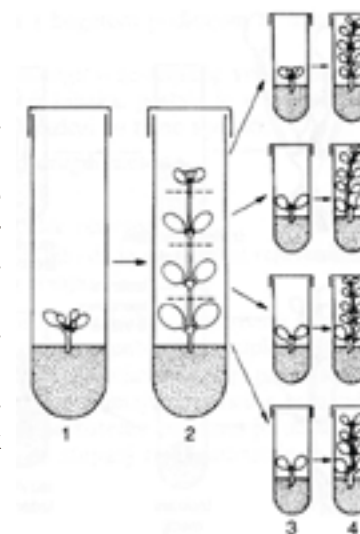
Utjecaj fizikalnih čimbenika na rast kultura

Fizički su čimbenici vrlo bitni za pravilan razvoj kulture i regulirani su unutar klima komore. Svjetlost, kao složeni čimbenik, može utjecati na rast kulture količinom zračenja, djelovanjem duljine dana i sastavom svjetlosnog spektra. Temperatura je obično konstantna u klima komori. Vlažnost je unutar posude s kulturom obično 100% (vidljivo kao kondenzat na stjenkama posude) pa se vlaga regulira smanjenjem vlažnosti klima-komore, što smanjuje vlagu unutar posude. Raspoloživost vode za kulturu regulirana je koncentracijom agara. Kisik je važan čimbenik za rast stanica i tkiva, a prozračivanje podloge postiže se trešnjom tekućih podloga i zatvaranjem posuda s kulturom na čvrstim podlogama metalnim ili plastičnim poklopcima. Koncentracija ugljičnog-dioksida u dobro zatvorenim posudama često je dovoljna jer je podloga sa saharozom povoljan izvor ugljika, no u nekim se slučajevima ugljik-dioksid može dodati u klima-komoru. Potreban fotoperiod za uzgoj vinove loze in-vitro je 12 satni ili 16 satni, za spektralni sastav koriste se bijele hladne fluorescentne lampe. Temperatura se održava u rasponu od 24°C do 28°C, a relativna je vlaga zraka 55% do 60% u klima-komori, kako ne bi došlo do razvoja infekcije na kulturi.

Metode mikrorazmnožavanja

Mikrorazmnožavanje pojedinačnim nodijskim segmentima

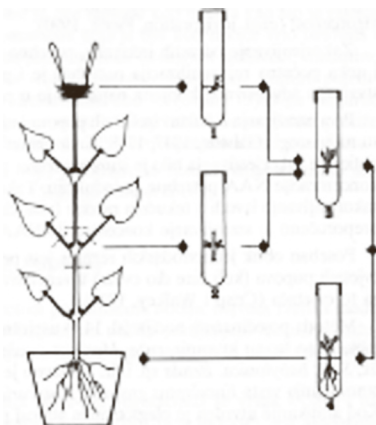
Priprema tehnike počinje izolacijom pupova zajedno s komadićem pripadajuće stabljike zbog poticanja razvitka izdanaka. To je najprirodnija metoda vegetativnog razmnožavanja in-vitro jer se primjenjuje i in-vivo. Pupovi koji se nalaze u pazušcu lista, a također i vršni, mogu se odvojiti od biljke i kultivirati na hranidbenoj podlozi zbog poticanja razvitka izdanaka. Da bi se smanjila mogućnost infekcije, preporučuje se izolacija zatvorenih pupova. Pupovi u pazušcima listova novonastale stabljike mogu biti ponovno supkultivirani i taj se postupak može kontinuirano ponavljati. Kada se dobije dovoljno izdanaka, oni moraju biti zakorijenjeni i preneseni u zemlju. Izdvajanje pupova i vegetacijskog vrška tehnika je koja načelno ne traži upotrebu citokinina za prekid apikalne dominacije (kočenje rasta bočnih pupova djelovanjem vršnog pupa stabljike). Stopa razmnožavanja ovisi o broju raspoloživih pupova. Ta je metoda najuspješnija za primjenu na potomcima divlje loze (*Vitis rupestris*).



Vinova je loza drvenasta biljka umjerenih područja pa je potrebno obratiti pozornost na pojavu dormantnosti nakon izolacije in-vitro, a postupci za ukidanje te dormantnosti su: izlaganje niskoj temperaturi 0-5 °C, zadovoljenje fotoperiodizma izlaganjem biljke 16 satnoj duljini dana i po potrebi tretiranje citokininima i giberelinima.

Metoda aksilarnog pupanja (grananja)

Ta je metoda danas najraširenija i najpouzdanija metoda mikrorazmnožavanja biljaka. Stopa umnožavanja relativno je visoka, genetička je stabilnost uglavnom najčešće očuvana, a rast tako dobivenih biljaka vrlo je dobar. Metoda je vrlo slična metodi kulture pojedinačnih nodija, a razlikuje se u tome što se kod pojedinačnih nodija primjenjuje isključivo izduživanje stabljike te da dodavanje citokinina nije potrebno ili tek u vrlo malim količinama. Metodom aksilarnog pupanja vegetacijski se vršak izolira i na podlozi s relativnom visokom koncentracijom citokinina inducira se rast aksilarnih pupova u pazušcima listova. Tako velika koncentracija citokinina poništava apikalnu dominaciju i dopušta razvitak aksilarnih pupova. Kada se izdanci razvijaju, mogu se presaditi na svježju podlogu i taj postupak se ponavlja sve dok se ne postigne traženi broj izdanaka koji se onda zakorijenjuju i prenose u zemlju.



Iako postoje i druge metode razmnožavanja, gore navedene su najčešće i najbitnije za vinovu lozu.

Eliminacija virusa biotehničkim metodama

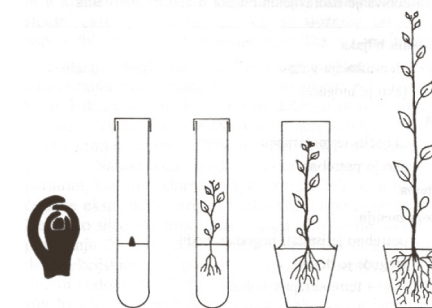
Virusi i njihova akumulacija tijekom dužeg razdoblja vegetativnog razmnožavanja ima štetan utjecaj na rast i razvoj biljaka (Pierik, 1987.). Štetan utjecaj virusa odnosi se na kvalitetu, urod i životni vijek biljaka (Maletić i sur., 2008.). Međunarodno vijeće za proučavanje virusa i virusima sličnih bolesti vinove loze spominje više od 70 štetnih bolesti vinove loze (virusa, viroida i fitoplazmi).

Da bi određeni materijal dobio potvrdu da nije zaražen gospodarski važnim virusima, mora biti testiran i negativan na ove viruse: GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3 i ArMV, te još dodatno i na GfKV za podloge. Prema propisima EU-a (direktiva 2005/437EC) materijal je klasificiran kao „certificirani sadni materijal“, engl. „virus free“.

Kultura meristemskih vršaka - proizvodnja bezvirusnih (Virus-free) biljaka

Provodi se izrezivanjem meristemskih vršaka i njihovim uzgojem na odgovarajućoj hranjivoj podlozi u optimalnim uvjetima vlage, topline i svjetla. Tehnika se zasniva na

neravnomjerno rasprostranjenim česticama virusa u tkivu domaćina, kojih nema u krajnjim vršcima meristema. Veličina eksplantata je vrlo kritična jer kada je premali, izostaje regeneracija, a kada je prevelik, sadržava čestice virusa. Najidealnije je uzeti vršni meristem bez primordijalnih listića. Metoda se zasniva na kulturi vegetacijskog vrška najmanjih mogućih dimenzija koje još mogu rasti u kulturi i stvoriti izdanak. No takav sićušni eksplantat traži mnogo složeniji sastav hranidbene podloge u usporedbi s kulturom vegetacijskog vrška.



Termoterapija (toplinski postupak)

Toplinski postupak uspješno eliminira izometrične viruse i bolesti koje uzrokuju mikoplazme i nije djelotvoran ako su biljke osjetljive na povišenje temperature ili pak virusi ili mikoplazme zbog nekih razloga ne reagiraju na povišenu temperaturu. U nekim slučajevima toplinski postupak može djelotvorno inaktivirati određene viruse. Toplinski postupak posebno je djelotvoran u slučaju virusa i mikoplazma na vinovoj lozi. Važan je kod drvenastih voćaka kod kojih se kultura meristema vrlo teško stvara. Kod drvenastih kultura samo se aksilarni pupovi mogu osloboditi od virusa toplinskom obradom. Grane tih biljaka cijepaju se na podloge i drže se 20-40 dana ili nekoliko mjeseci na temperaturi od 37-38 °C. Taj postupak daje visok postotak biljaka oslobođenih od virusa. Zdrava vinova loza koja više ne sadrži viruse može se dobiti držanjem izdanaka (meristema) in-vitro 21 dan na temperaturi od 35°C. Tim se postupkom loza može osloboditi od virusa kao što su: GVA (Grapevine virus A) i virusa njegove skupine GVB, GVC i GVD. Navedenima još pripadaju i virusi GFkV (grapevine flack virus), GFLV (grapevine fanleaf virus) i mnogi dr.

Termoterapija i kultura meristema

Primjenjuje se da bi se povećala mogućnost dobivanja bezvirusnih biljaka onda kada je posrijedi više tipova infekcije. Toplinski se postupak često prakticira na početku kulture meristema, s tim se smanjuje koncentracija virusa, a zona tkiva slobodnog, bez virusa, povećava se.

„Blažina (1992.) je uspješno uklonio upotrebom kulture meristema in vitro i termoterapije GFLV virus u cv. Zelen kod 85% eksplantata (detektirano ELISA testom). Primjena meristemске kulture in vitro na cv. Refošk bila je 100% uspješna u pogledu eliminacije klosterovirusa (GLRaV, tip 1 i 3), dok je samo 60% eksplantata bilo bez GFLV-a, analizirano testom ELISA (Koruza i Jelaska, 1993.)“ (Maletić i sur., 2008.)

Krioterapija

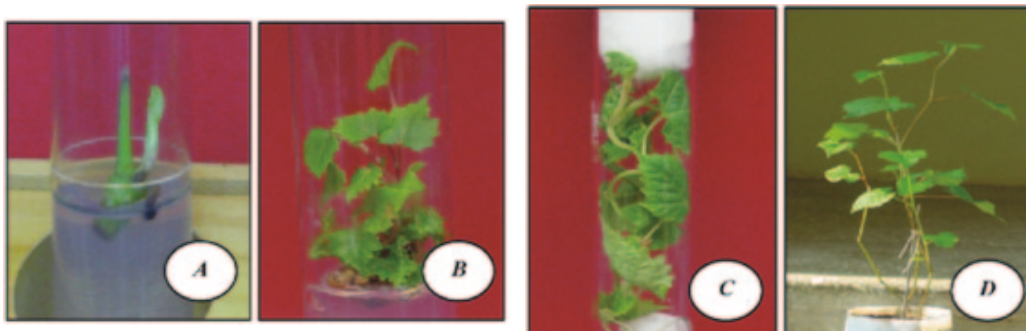
Krioterapija izdanaka je nova metoda za iskorjenjivanje patogena na temelju tehnika zamrzavanja. Krioprezervacija odnosi se na skladištenje bioloških uzoraka na ultra-niske

temperature, obično tekućim dušikom (-196 ° C), te se smatra kao idealno sredstvo za dugotrajnu pohranu biljne germplazme. U krioterapiji, biljni patogeni kao što su virusi, fitoplazme i bakterije iskorijenjeni su izlažući izdanke veličine 0,5-2,0 mm na kratko, tekućem dušiku. Neravnomjerna distribucija virusa i obilgatno vaskularno ograničenih mikroorganizama u izdancima omogućava eliminaciju inficiranih stanica tako da ih se uništi krio-liječenjem i izvrši regeneracija zdravim izdancima koji su preživjeli patogene - zdrave meristemske stanice. Krioterapija izdanaka je jednostavna za implementaciju. Dopušta tretman na velikom broju uzoraka sa visokim postotkom čistoće.

Na vinovoj lozi primjena ove metode bila je učinkovita u eliminaciji virusa (A) vinove loze (Wang, 2003).

Mikrocijepljenje vegetativnog vrha

U slučajevima kada kultura meristemskih vršaka ne funkcionira, dobro eksplantate meristemskih vršaka moguće je uzeti sa zaraženih biljaka preciznim alatom u aseptičnim uvjetima i cijepiti na vegetativni vrh mladih bezvirusnih biljaka iste vrste uzgojenih in-vitro. Na taj način izostaje potreba regeneracije cijele biljke, već nacijepljeni meristemski vršak srasta s već razvijenom biljkom. Ta je metoda vrlo važna za drvenaste vrste pa tako i za vinovu lozu. Prilikom provođenja metode treba uzeti u obzir fenomen inkompatibilnosti. Koriste se meristemske vršci, bez nodijskih dijelova promjera 0,3 mm na kojima se urezuje rascjep te se nacijepuju na podlogu sa 3-4 pupa. Cijeli se set kultivira in-vitro na hranjivoj podlozi tipa MS. Koriste se životinjski serumi za olakšavanje razvoja meristema i ubrzanje diferencijacije stanica. Ozdravljenje kalusa nastupa tijekom prvih 6 dana, a uspostavljanje vaskularnih spojeva od 8 do 12 dana nakon presađivanja.



Zaključak

Biotehnologija kao znanstvena disciplina i sve metode okupljene u njoj dale su obilat napredak u agro-znanosti. Posebice se ističe vinogradarstvo u kojem njezina važnost raste. Biotehnološkim tehnikama moguće je dobiti zdrav sadni materijal u kraćem vremenskom roku u odnosu na klasično rasadničarstvo. Treba napomenuti da je primjena biotehnoloških metoda u svojim začecima i znanstvenici rade na jedinstvenom protokolu

biotehnoloških metoda koji bi rezultirao visokom multiplikacijskom stopom uz eventualno čišćenje virusa.

Iako je prema Preineru svjetska gospodarska kriza zaustavila rast vinogradarsko-vinarske proizvodnje, činjenica je da će biotehnologija uzdrmati svijet vinogradarstva i osigurati mu daljnji napredak te ulaganja kako bi nastala što kvalitetnija vina diljem svijeta.

Literatura

- Jain, S. M. and Häggman, H.: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Springer (2003.)
 Sibila, J.: Kultura biljnih stanica i tkiva, Školska knjiga, Zagreb (1994.)
 Pierik, R.I.M.: In Vitro Culture of Higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, (1987.) str.169 – 181
 Maletić, E., Karoglan Kontić, J. i Pejić, I. (2008.): Vinova loza, ampelografija, ekologija, oplemenjivanje
 Wang, Q., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I., Tanne, E.: Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. (2003.)
 Preiner, D.: Svjetski trendovi u vinogradarstvu, Glasnik zaštite bilja, br.6, (2010.)

surveying study

Biotechnology in wine growing

Summary

There has been a trend in recent years to improve in vitro cell and tissue culture, to revise current methods in the purpose of increasing genetic improvement of grapevine (faster selection and breeding process), virus eradication and rapid clonal propagation. Micropropagation techniques of vitis varieties and cultivars of *Vitis vinifera* are well-developed and accepted, and nodal segment technique is the most widely used. A special interest is on the achievement of virus-free plants which can be achieved by meristem culture, with or without thermotherapy. Good results were achieved by micrografting, and more recently cryopreservation. However, further research should be done to establish protocols for each technique for the genetic improvement of grapevine.

Key words: *Vitis vinifera*, in vitro tissue and cell culture, micropropagation, genetic improvement