

**OPIS IZUMA****Područje tehnike na koje se izum odnosi**

- 5 Ovaj izum odnosi se na postupak uklanjanje virusa i/ili fitoplazmi iz zaraženog sadnog materijala vinove loze (*Vitis vinifera*) u svrhu dobivanja nezaraženog sadnog materijala prikladnog za podizanje baznog nasada vinove loze.

**Tehnički problem**

- 10 Sadni materijal vinove loze koji se koristi za podizanje baznih nasada vinove loze poželjno je onaj koji je očišćen od virusa i/ili fitoplazmi. Nasadi vinove loze kod kojih je korišten nezaraženi sadni materijal imaju bolje parametre rasta, bolji prinos, duži životni vijek te kakvoću vina. Također, u nekim državama postoji i obveza korištenja isključivo nezaraženog sadnog materijala, kao npr. u Europskoj Uniji. Međutim, standardnim postupkom za uklanjanje virusa i/ili fitoplazmi iz zaraženog sadnog materijala ne postiže se dovoljna učinkovitost u smislu broja uklonjenih virusa, i stope preživljavanja, a vrlo su česte i neželjene posljedice kao što su genetička nestabilnost i smanjena regenerabilnost sadnog materijala.

**Stanje tehnike**

- 20 Standardni postupak ozdravljanja vinove loze od virusa postiže se kulturom vršnog meristema (Sim 2006, FPS Grape Program Newsletter 30-31; Sim i Golino 2010, FPS Grape Program Newsletter 12-15). Vršni meristem čine matične stanice izdanka koje se razmjerno brzo dijele. Suština ove tehnike ozdravljanja proizlazi iz činjenice da meristem ne sadrži provodne elemente kojima bi se virus mogao brzo širiti. Dodatno, zbog neuobičajeno brzih dioba stanica, virus se ne stiče replicirati istom brzinom i inficirati nove stanice. Stoga se mehaničkim putem izolira najmlađi dio meristema, iz kojeg je moguća regeneracija zdrave biljke korištenjem metoda kulture biljnog tkiva. Ova tehnika ozdravljanja je vrlo zahtjevna ponajviše zbog činjenice da dimenzije izoliranog meristema (eksplantata) moraju biti što manja (za vinovu lozu je to oko 0,5 mm) kako bi se smanjio rizik kontakta s provodnim sustavom i virusnim česticama tijekom manipulacije. Dodatnu otežavajuću okolnost predstavlja niska stopa preživljavanja ovako malih eksplantata u kulturi tkiva (prema aktualnim podacima ona iznosi 10-30 %). Uz sve navedeno, ponekad je potrebno usporiti širenje virusa kroz meristem termoterapijom, kratkotrajnim izlaganjem biljke povišenim temperaturama (Wang i sur. 2018, Plant Methods 14:87). U novije vrijeme uvode se i nove metode koje uključuju postupke tzv. kemoterapije odnosno aplikacije „kemoterapeutskih“ tvari na biljno tkivo (Skiada i sur. 2013, Eur J Plant Pathol 135:407–414). Dodatni tretmani povećavaju stopu neželjenih posljedica kao što su npr. genetička nestabilnost, smanjena regenerabilnost uslijed toplinskog ili manipulativnog stresa i sl. (Skiada i sur. 2013, Eur J Plant Pathol 135:407–414, i tamo citirani radovi).

- 35 Trajanje ozdravljanja navedenim postupcima u uhodanim laboratorijima traje u prosijeku 8 tjedana tijekom kojih se iz jednog eksplantata (izoliranog meristema) dobije tzv. mikroizdanak, uz stopu preživljenja od 10-30 %. Nadalje, efikasnost eliminacije, ovisno o tipu virusa iznosi u idealnom slučaju oko 70-80 %. Stopa preživljavanja kroz cijeli postupak je vrlo niska sve do čak 0% kod nekih kultivara.

- 40 S druge strane, neki tipovi virusa vinove loze mogu preživjeti sve do sada opisane postupke temeljene na kulturi meristema. Važno je istaknuti da je za GRSPaV (eng. *grapevine rupestris stem pitting-associated virus*) iz grupe *Rugose wood complex virusa*, koji je proširen u gotovo svim vinogradarskim regijama, eliminacija do danas ostala neuspješna svim metodama u kulturi meristema. Prisutnost upravo ovoga virusa, ali i brojnih drugih za sada se tolerira zbog tehnički teškog ili nemogućeg uklanjanja. Međutim, efekti eliminacije virusa na vitalnost biljke, prinos i kvalitetu ploda vinove loze evaluiraju se kontinuirano i ukazuju na važnost potpunog „ozdravljanja“ sadnog materijala u poboljšanju kvalitete vinogradarske proizvodnje te na važnost nedvojbene detekcije „bezvirusnosti“ sadnog materijala i podloga (Anonymous, 2008, Certification scheme. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. EPPO Bulletin, 38, 422–429).

50

**Izlaganje biti izuma**

- 55 Ovaj izum opisuje novi, efikasan sustav poticanja somatske embriogeneze kultivara vinove loze, u kojem se induciraju somatski embriji koji se razvijaju kroz sve razvojne faze od embrija do odraslih biljaka. Biljke zadržavaju sortni identitet i ne pokazuju znakove somaklonske varijabilnosti ili poliploidije, problema koji se povezuju s kulturom biljnog tkiva. Postupak za uklanjanje virusa i/ili fitoplazmi iz zaraženog sadnog materijala vinove loze (*Vitis vinifera*), prema sadašnjem izumu, obuhvaća slijedeće korake: a) odabir ishodišnog tkiva; b) sterilizacija ishodišnog tkiva; c) izolacija i uvođenje eksplantata u kulturu tkiva; d) indukcija embriogeneze; e) sazrijevanje embrija; f) klijanje embrija i regeneracija biljaka; g) aklimatizacija biljaka na okolišne uvjete i rast na zemljanom supstratu u izoliranom sustavu.

60

Ovim postupkom dobivaju se regeneranati kod kojih je 70% - 90% njih negativno na viruse i fitoplazme (testirano ELISA-om i RT-PCR), a ilustrirani su slijedećim primjerima, koji ne ograničavaju opseg zaštite izuma.

### **Kratak opis slika**

5

Slika 1 Razvojni stadiji somatske embriogeneze do razvitka biljke. Slika primjenjiva za sve kultivare.  
Slika 2 Embriogeni kalus Malvazije istarske. Svaka struktura je jedan embrij s potencijalom razvoja u biljku, čime ostvarujemo neograničen izvor biljnoga materijala. Slika primjenjiva za sve kultivare.

### **Primjeri izvođenja izuma**

Eksperimentalni dio

#### a) Odabir ishodišnog tkiva

15

Odabir eksplantata temelji se na njegovom potencijalu da se u što kraćem vremenu, primjenom što manjih koncentracija biljnih regulatora rasta, potakne dediferencijacija stanica i inicijacija embriogenog potencijala. Kao pogodan tip eksplantata mogu se koristiti izolirani prašnici u razvojnem stadiju u kojem filament doseže 50 % maksimalne elongacije te je još uvijek u fazi produžnog rasta bez vidljivih znakova apopoze. Optimalan stadij može se odrediti prema boji prašnice koja je transparentno blijedo-žuta, a omjer longitudinalne duljine filameta i prašnice iznosi 0,5 : 1 do 1 : 1. Ukupna duljina prašnika je 0,8 – 1,2 mm. Ovaj razvojni stadij prašnika nalazi se u neotvorenim pupovima čiji najširi promjer iznosi 1,5 – 2,0 mm. Pojedinačni cvjetni pupovi izdvajaju se iz cvata u sterilnim uvjetima i otvaraju transferzalnim rezom bazalne površine pupa korištenjem skalpela, na mjestu gdje su filament prašnika spojeni na tkivo tučka. Izolira se cijeli prašnik (prašnica i filament).

25

#### b) Sterilizacija ishodišnog tkiva

Cvatovi koji će biti korišteni kao izvor eksplantata inkubiraju se u 70% etanolu 1 minutu, nakon čega se ispiru 2-3 puta u sterilnoj destiliranoj vodi. Potom se inkubiraju u 50% otopini natrijevog hipoklorita (NaOCl; 13 % koncentracija aktivnog klor), 0.1% *Mucosal*-a (Merz Consumer Care GmbH) i 0.1% *Tween*-a uz konstantno miješanje. Nakon toga, cvatovi se 3 puta ispiru sterilnom destiliranom vodom u laminaru. Konačno, tako sterilizirani cvatovi ostavljaju se 1-3 dana na 4 °C na sterilnom filter papiru u Petrijvoj zdjelici zatvorenoj *Parafilm*-om nakon čega slijedi izolacija eksplantata i uvođenje u kulturu.

35

#### c) Izolacija i uvođenje eksplantata u kulturu tkiva

Filamenti prašnika odvajaju se od ostatka cvijeta (otvorenog pupa) rezom na bazi upotrebom mikrodisekcijske iglice te se zajedno s pripadajućom prašnicom nasađuju na hranjivu. Eksplantati iz pet pupova nasađuje se u jednu petrijevu posudu (30 mm x 10 mm).

40

#### d) Indukcija embriogeneze

Indukcija embriogeneze provodi se na modificiranoj MS podlozi (Murashige i Skoog, 1962, *Physiol. Plant.* 15:473–497) bez dušikovih makrosoli i glicina te dušikovim solima podloge X6 (Li i sur. 2008, *Plant Sci.* 160:877–887). Podloga se obogaćuje s 2% (v/w) saharoze te kombinacijom regulatora rasta 2,4-D, BAP i NOA u omjerima koji ovise o kultivaru. Prije dodatka agara (7 % v/w) i sterilizacije podešava se pH podloge na 5,8 te se sterilizacija provodi pri 121 °C, 103kPa 15 minuta. Uvjeti kultivacije su 26 °C uz konstantnu izloženost tami.

50

#### e) Sazrijevanje embrija

Proembriogena masa stanica inokulira se na podlogu X6 bez dodatka hormona, uz dodatak aktivnog ugljena. Prije dodatka agara (7 % v/w) i sterilizacije, podešava se pH podloge na 5,8 te se sterilizacija provodi pri 121 °C, 103kPa 15 minuta. Uvjeti kultivacije su 26 °C, fotoperiod 16/8 uz upotrebu fluorescentnih lampi (65 μmole m<sup>2</sup>s). Subkultivacija se provodi u intervalima od 4 – 6 tjedana.

55

#### f) Klijanje i regeneracija biljaka

Kotiledonarni embriji potiču se na klijanje na podlozi EG obogaćenoj sa 10 μM IAA and 1 μM GA3 (López-Pérez i sur. 2005, *Vitis* 44 (2), 79–85). Po pet embrija inokulira se u petrijevu posudicu (30 mm x 10 mm) i kultivira vertikalno (korijen dolje). Uvjeti kultivacije su 26 °C, fotoperiod 16/8 uz upotrebu fluorescentnih lampi (65 μmole m<sup>2</sup>s). Razvijene biljčice kontinuirano se prebacuju u staklene epruvete (promjer 3cm, dužina 16 cm) s 20 ml medija u svrhu osiguranja robusnijeg rasta. Kada veličina izdanka dosegne 5 – 10 cm (> 5 pravih listova), biljčice se presađuju u plastične lončice

60

(7x7x4 cm) napunjene zemljanim substratom i pijeskom u omjeru 5:1 (Steckmedium, Klassman-Deilmann, Germany) te se smještaju u kutije Magenta M-7 radi postepene aklimatizacije. Aklimatizacija se provodi tijekom razdoblja od 7-10 dana. Neposredno nakon prenošenja biljaka na tlo, poklopac Magenta kutije mora biti čvrsto zatvoren kako bi se razvili uvjeti visoke vlažnosti. Počevši od 3. dana, poklopac se pomalo otpušta do 5. dana, kada se potpuno uklanja i stavlja na vrh posude Magenta na način koji omogućava laganu, ali izravnu cirkulaciju zraka. Od 6. do 10. dana cirkulacija zraka postupno se povećava mijenjanjem položaja poklopca koji se na kraju potpuno ukloni. Ako se biljke dobro aklimatiziraju, lišće će početi snažno rasti tijekom idućih 1-2 tjedna.

### Primjer 1

Vitis vinifera L. cv. Plavac mali

Testirana je ishodišna biljka Plavca malog (sivog) te u njoj utvrđena prisutnost 3 tipa virusa (GVA, GLRaV-3 i GFLV), a 90 % regeneranata dobivenih somatskom embriogenezom (prema gore navedenom eksperimentalnom postupku) bilo negativno na iste viruse (testirano ELISA-om i RT-PCR).

Broj početnih eksplantata	Broj neovisnih embriogenih kalusa	Broj regeneriranih biljaka	Testirani virusi	Broj ozdravljenih biljaka
200	18	10	GVA, GLRaV-3 i GFLV	7 (u dvije biljke prisutni GLRaV-3 i GFLV)

### Primjer 2

Vitis vinifera L. cv. Malvazija istarska

Nakon postupka ozdravljanja metodom RT-PCR-a testirano je 10 biljaka od kojih je 8 bilo negativno na sve viruse dok su dvije ostale inficirane virusom GLRaV-1 i GFLV.

Broj početnih eksplantata	Broj neovisnih embriogenih kalusa	Broj regeneriranih biljaka	Testirani virusi	Broj ozdravljenih biljaka
50	27	10	ArMV, GFLV, RSPaV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3.	8 (u dvije biljke prisutni GLRaV-1 i GFLV)

### Primjer 3

Vitis vinifera L. cv. Babica

Nakon postupka ozdravljanja testirano je metodom RT-PCR-a 10 biljaka od kojih je 9 bilo negativno na prisutnost svih virusa, dok je jedna ostale inficirane virusom GFLV.

Broj početnih eksplantata	Broj neovisnih embriogenih kalusa	Broj regeneriranih biljaka	Testirani virusi	Broj ozdravljenih biljaka
50	35	10	ArMV, GFLV, RSPaV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3.	9 (u jednoj biljci prisutan GFLV)

### Primjer 4

Vitis vinifera L. cv. Pošip

Embriogeni kalus Pošipa. Svaka struktura je jedan embrij s potencijalom razvoja u biljku, čime ostvarujemo neograničen izvor biljnoga materijala.

Visoka uspješnost indukcije somatske embriogeneze (50 eksplantata/30 kalusnih kultura). Dobar regeneracijski potencijal. Prisutnost virusa nije testirana.

**Primjer 5**

Vitis vinifera L. cv. Ljutun

- 5 Visoka uspješnost indukcije somatske embriogeneze (50 eksplantata/33 kalusnih kultura). Dobar regeneracijski potencijal. Prisutnost virusa nije testirana.

**Primjer 6**

10 Vitis vinifera L. cv. Teran

Visoka uspješnost indukcije somatske embriogeneze (50 eksplantata/29 kalusnih kultura). Dobar regeneracijski potencijal. Prisutnost virusa nije testirana.

15 **Primjer 7**

Vitis vinifera L. cv. Malvazija dubrovačka

- 20 Srednja uspješnost indukcije somatske embriogeneze (50 eksplantata/8 kalusnih kultura). Dobar regeneracijski potencijal. Prisutnost virusa nije testirana.

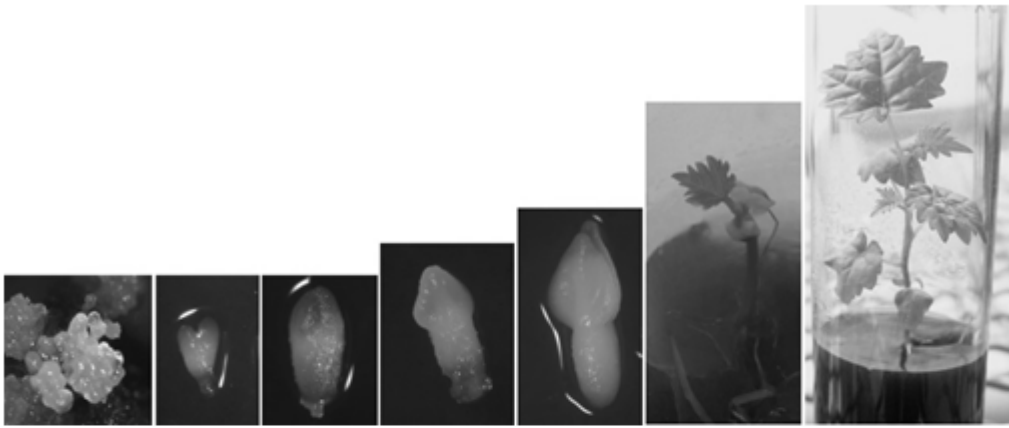
**Primjer 8**

Vitis vinifera L. cv. Babić

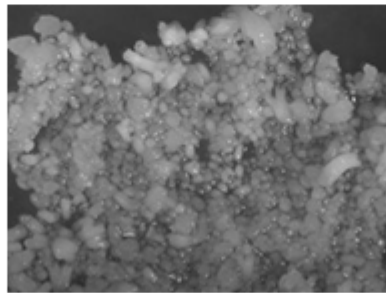
- 25 Srednja uspješnost indukcije somatske embriogeneze (50 eksplantata/27 kalusnih kultura). Dobar regeneracijski potencijal. Prisutnost virusa nije testirana.

30 **PATENTNI ZAHTJEVI**

1. Postupak za uklanjanje virusa i/ili fitoplazmi iz zaraženog sadnog materijala vinove loze, **naznačen time** da, obuhvaća slijedeće korake:
  - 35 a) Odabir ishodišnog tkiva
  - b) Sterilizacija ishodišnog tkiva
  - c) Izolacija i uvođenje eksplantata u kulturu tkiva
  - d) Indukcija embriogeneze
  - e) Sazrijevanje embrija
  - 40 f) Klijanje embrija i regeneracija biljaka
  - g) Aklimatizacija biljaka na okolišne uvjete i rast na zemljanom supstratu u izoliranom sustavu.
2. Postupak prema patentnom zahtjevu 1, **naznačen time** da se vinova loza bira iz skupine: plavac mali, malvazija istarska, babica, babiće, pošip, ljutun, teran i malvazija dubrovačka.
3. Sadni materijal vinove loze iz kojeg su uklonjeni virusi i/ili fitoplazme, **naznačen time** da je dobiven postupkom prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 i 2.
- 45 4. Sadni materijal vinove loze prema patentnom zahtjevu 3, **naznačen time** da je za uporabu u postupku podizanja baznog nasada vinove loze.



Slika 1



Slika 2