Reducirana oplodnja cv. Grk (V. vinifera L.) i njen utjecaj na kvalitetu grožđa i vina

Stupić, Domagoj

Doctoral thesis / Disertacija

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:204:698319

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

Domagoj Stupić

REDUCIRANA OPLODNJA CV. GRK (*V. VINIFERA* L.) I NJEN UTJECAJ NA KVALITETU GROŽĐA I VINA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Domagoj Stupić

REDUCED FERTILIZATION OF THE GRAPEVINE VARIETY GRK (*V. VINIFERA* L.) AND ITS IMPACT ON THE GRAPE AND WINE QUALITY

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016



Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Domagoj Stupić

REDUCIRANA OPLODNJA CV. GRK (*V. VINIFERA* L.) I NJEN UTJECAJ NA KVALITETU GROŽĐA I VINA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Prof. dr. sc. Edi Maletić
Izv. prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Zagreb, 2016



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Domagoj Stupić

REDUCED FERTILIZATION OF THE GRAPEVINE VARIETY GRK (*V. VINIFERA* L.) AND ITS IMPACT ON THE GRAPE AND WINE QUALITY

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Prof. dr. sc. Edi Maletić
Assoc. prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Zagreb, 2016

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje:Poljoprivreda (agronomija)

Znanstvena grana: Vinogradarstvo i vinarstvo

Institucija: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

Voditelj doktorskog rada: Prof. dr. sc. Edi Maletić i Prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Broj stranica: 132

Broj slika: 31

Broj tablica: 25

Broj grafova: 11

Broj priloga: 1

Broj literaturnih refefernci: 142

Datum obrane doktorskoga rada:

Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:

Rad je pohranjen u:

Ncionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p. 550, 10 000 Zagreb, Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog Fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana _____ , te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana _____ .

Ovu disertaciju je ocijenilo povjerenstvo u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić,
redoviti profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. Doc. dr. sc. Sandro Bogdanović
docent Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

3. Doc. dr. sc. Nenad Malenica
docent prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u zagrebu, biološki odsjek

Disertacija je obranjena na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, _____. pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić, _____
redoviti profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. Doc. dr. sc. Sandro Bogdanović, _____
docent Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

3. Doc. dr. sc. Nenad Malenica, _____
docent prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u zagrebu, biološki odsjek

Mentor: Prof. dr. sc. Edi Maletić

Edi Maletić rođen je 7. rujna 1962. u Kninu, Republika Hrvatska. Nakon završetka srednje ekonomske škole u Zadru, upisuje Fakultet poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu. Diplomiro je 1986. godine na istom Fakultetu, s naslovom „Ampelografska istraživanja nekih introduciranih sorata u uvjetima Ravnih Kotara“. Magistrirao je na Biotehničkom Fakultetu, Sveučilišta u Ljubljani 1993. godine, s naslovom „Ampelografska istraživanja kultivara Maraština, Bogdanuša, Vugava i Pošip (*Vitis vinifera* L.) u uvjetima Ravnih Kotara, Primorska Hrvatska“. Doktorsku disertaciju pod naslovom “Utjecaj podloga na biološka i gospodarska svojstva kultivara Chardonnay (*Vitis vinifera* L.)” obranio je 1999., na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1987. godine radi na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo. U zvanje redovitog profesora je izabran 2010. godine a u zvanje profesora u trajnom zvanju 2016. godine. Nositelj je modula Uvod u tehnologiju grožđa i vina na preddiplomskom, Ampelogafija i Lozno rasadničarstvo na diplomskom, te Metode ampelografskih istraživanja na poslijediplomskom studiju. Kao voditelj i suradnik sudjelovao je na nekolicini znastvenih (međunarodnih i nacionalnih) i stručnih projekata.

U razdoblju od 2003. do 2015. godine bio je dopredsjednik radne grupe Vitis pri ECP/GR (Rim, Italija). Od 2007. hrvatski je predstavnik u OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, Paris) Commision viticulture, i ekspert u grupi Grapevine genetics and selection. Član je uređivačkog odbora znanstvenog časopisa Journal of Central European Agriculture (JCEA). Službeni je ocjenjivač vina u Republici Hrvatskoj. Dobitnik je godišnje državne nagrade za znanost (biotehničke znanosti, kategorija znanstveno otkriće) za 2003. godinu, te nagrade grada Kaštela («Trpimirova darovnica») 2003. godine. Od 2006. do 2012. godine obnašao je dužnost prodekana za znanost Agronomskog fakulteta, a od ak. god. 2012./2013. predstojnik je Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo. Redoviti je profesor na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo.

Prof. dr. sc. Dunje Leljak- Levanić

Leljak Levanić Dunja, izvanredna profesorica, rođena je 11. travnja 1970. godine u Varaždinu. Diplomirala je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 1993. godine s temom "Somatska embriogeneza bundeve na hranidbenoj podlozi bez hormona“, magistrirala na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 1997. godine s temom "Kontrola somatske embriogeneze dušikovim spojevima u kulturi tkiva bundeve" i doktorirala na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2001. godine s temom "Metilacija DNA, izvanstanični glikoproteini i sinteza kaloze tijekom somatske embriogeneze bundeve".

Od 1994. godine zaposlena ja na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U znanstveno-nastavno zvanje docenta izabrana je 2005. godine a 2013. godine bira se u znanstveno-nastavno zvanje izvanredne profesorice na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nositeljica je kolegija Biologija razvoja, Mehanizmi biljnog razvitka te kolegija Metodologija znanstveno istraživačkog rada koji se izvode na preddiplomskim i diplomskim studijima, kao i kolegija Biljna embriogenaza na Doktorskom studiju biologije.
Koautorica je 26 znanstvenih radova i 5 poglavlja u knjigama. Problematika kojom se bavi je razvojna biologija biljaka u sklopu koje se najveći opus istraživanja odnosi na biljnu somatsku i zigotnu embriogenezu.

Članica je nekoliko strukovnih društava i udruga (Hrvatskog Biološko društvo 1885, Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, Hrvatsko društvo za biljnu biologiju, „International Asocciation for Plant Reproduction“, „International Association for Plant Biotechnology”, Klub hrvatskih Humboldtovaca), te je obnašala dužnosti predsjednice Hrvatskog društva za biljnu biologiju i dopredsjednica Kluba Hrvatskih Humboldtovaca.

Dunja Leljak Levanić dobitnica je stipendije Alexander von Humbolt te se poslije doktorata usavršavala na Zavodu za razvojnu biologiju i biotehnologiju Sveučilista u Hamburgu od svibnja 2004. do 2006., te višekratno na Zavodu za biologiju i biokemiju biljaka Sveučilišta u Regensburgu.

ZAHVALE

Zahvaljujem se svojim mentorima prof. dr. sc. Ediju Maletiću i prof. dr. sc. Dunji Leljak-Levanić na usmjeravanju mog istraživačkog rada, savjetima i potpori.

Zahvaljujem se profesorici dr. sc. Jasminki Karoglan- Kontić, doc.dr.sc. Sandru Bogdanoviću i doc. dr. sc. Nenadu Malenici na korisnim savjetima i podršci tijekom pisanja disertacije.

Zahvaljujem se kolegama doc.dr.sc. Darku Preineru, doc. dr. sc. Željku Andabaki, doc. dr. sc. Zvjezdani Marković i dr.sc. Silviju Šimonu na svesrdnoj i nadasve prijateljskoj pomoći tijekom istraživačkog rada i pisanja disertacije.

Zahvaljujem svim kolegama, studentima Agronomskog fakulteta i prijateljima koji su bili dio ove velike priče.

Hvala obiteljima Stupić, Jergan, Kobasić, Sušanj, Gojak i mojoj djevojci Mariji na pomoći i potpori u najtežim trenutcima.

Posebno hvala mojim roditeljima Ivanu i Višnji koji su bili najveći uzor i motiv za završetak ove životne priče, a to će ostati i ubuduće.

SAŽETAK

Grk je autohtona sorta vinove loze značajna danas za vinogradarsto Lumbarde i okolnog područja na otoku Korčule. Jedna je od rijetkih sorata vinove loze s funkcionalno ženskim cvijetom, što kod uzgoja ove sorte uzrokuje određene teškoće vezane uz oplodnju i razvoj bobica u grozdu. Sorta je specifična po pojavi malih, besjemenih bobica (lokalni naziv „pasoline") koje se u grozdu nalaze zajedno sa znatno većim bobicama koje sadrže sjemenke. Udio pojedininog tipa bobica unutar grozda vrlo je varijabilan. Ovim istraživanjem nastojalo se utvrditi koji su uzroci pojave besjemenih bobica kod sorte Grk vezani uz građu i razvitak muškog i ženskog gametofita, utvrditi utjecaj različitih sorata oprašivača na broj sjemenih bobica u grozdu te utvrditi varijacije kvalitete grožđa i vina uzrokovane različitim udijelima besjemenih bobica (pasolina). Analizom muškog gametofita utvrđeno je nepostojanje pora za klijanje na sporodermi peludi sorte Grk. Iz toga razloga pelud ove sorte je sterilna iako se razvoj gameta odvija normalno te zrelo peludno zrno sadrži dvije spermalne i jednu vegetativnu jezgru. Utvrđena je pravilna građa sjemenog zametka te prisutnost pojedinačnih stanica ženskog gametofita u zrelom stadiju. Embriji unutar sjemenoga zametka nastavljaju normalan razvoj kroz sve stadije razvoja ili dolazi do propadanja sjemenih zametaka. Proces propadanja započinje kod neoplođenih bobica veličine 4 mm.

Analiza utjecaja oprašivača na broj sjemenih bobica pokazuje da su najbolji oprašivači bili sorte Pošip (27,68% sjemenih bobica u grozdu) i Plavac mali (26,95% sjemenih bobica u grozdu) dok je najlošiji oprašivač sorta Chardonnay (9,73% sjemenih bobica u grozdu). Analizom kvalitete mošta utvrđeno je da velike sjemene bobice sadrže signifikantno veći sadržaj šećera u moštu i pH vrijednost mošta dok male besjemene bobice imaju signifikantno veći sadržaj kiselina.

Organoleptičkom analizom vina nije utvrđena signifikantna razlika između varijanata vina od 80% malih besjemenih bobica u grozdu i one sa 80% sjemenih bobica u grozdu. Signifikantnih razlika nije bilo niti u parametrima osnovne kemijske analize vina osim kod sadržaja pepela u korist vina sa podjednakim udjelom velikih sjemenih bobica i besjemenih bobica (pasolina). U vinu dobivenom od 80% pasolina utvrđeno je signifikantno najviše kafeinske, kumarinske i ferulinske kiseline te procijanidina B1 i resveratrola.

Ključne riječi: *Vitis vinifera* L., Grk, besjemenost, oprašivač, polifenoli, partenokarpija, stenospermokarpija, apomiksija

SUMMARY

Reduced fertilization of the grapevine variety Grk (*V. vinifera* L.) and its impact on the grape and wine quality

Grk is a native grapevine variety important for viticulture of the Lumbarda area on the island of Korčula. It is one of the rare grape varieties with functionally female flower, which causes certain difficulties in grape production associated with poor fertilization and the development of the berry. Each cluster of this variety contains small, seedless berries (local name *pasoline*) and large berries that contain seeds. The share of berries type within the cluster is highly variable. This study attempts to identify the causes of poor seedless berries development trough the analysis of structure and development of male and female gametophyte, to determine the effect of different pollinator varieties on the number of seeded berries in the cluster and to determine the impact of seedless berry share on quality of grapes and wine. Lack of germination pores on pollen sporoderma was found in the analysis. For this reason, the pollen of this variety is sterile, although the development of gametes takes place normally and mature pollen grain contains two sperms and a vegetative nucleus.

The structure of the ovule and the presence of individual cells of the female gametophyte in the mature stage were regular. Embryos inside the ovule develop normally through all the developmental stages, otherwise decay of the ovule takes place. The process of the ovule decay begins in unfertilized berries which are 4 mm in size. The decline of ovules caused by two processes: parthenocarpy and stenospermocarpy. Parthenocarpy occurs in berries in which there has been no fertilization. The stenospermocarpy occurs with berries where there has been a process of fertilization but cessation of ovul growth and its degeneration was caused by unknown physiological factors within the plant. In embrio sac of certain berries whose stigmas in the opening flower remained covered with flower cap, there was deternin existence of the zygote in the phase of intensive elongation. Ther was also obvious that both sinergide look identical and non-degenerate, indicating that there was no penetration of the pollen tubes and no proper fertilization proces occured. This fact potentially leads to a hypothesis that in vines can reach process of apomixis.

The analysis of the impact of pollinator variety on the number of seeded berries shows that the best pollinators were the following varieties: *Pošip* (27.68% seeded berries in a cluster) and *Plavac mali* (26.95% seeded berries in a cluster). The worst pollinator variety was Chardonnay (9.73% seeded berries in a cluster). The analysis of the must quality determined that the large seeded berries contain significantly higher sugar content and pH value while the small seedless berries have significantly higher acid content.

A significant difference between varieties of wine made from 80% of small seedless berries in the cluster and those made of 80% of the seeded berries in the cluster was not found in the organoleptic analysis. A significant difference was not determined even in the basic chemical composition of the wine except for ash content in the wine with equal share of large seeded berries and seedless berries. Significantly the largest content of caffeic, coumaric and ferulic acid, procyanidin B1 and resveratrol was found in the wine made from 80% seedless berries.

Keywords: *Vitis vinifera* L., Grk, seedless, pollinator, polyphenols, partenocarpy, stenospermocarpy, apomixis

Sadržaj

1 UVOD 1
2 HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA 6
3 PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 7
3.1 Građa hermafroditnog cvijeta vinove loze 7
3.1.1 Građa tučka 8
3.1.2 Razvitak sjemenih zametaka i ženskog gametofita 10
3.1.3 Građa prašnika 12
3.2 Funkcionalno ženski cvijet 15
3.3 Proces samooplodnje i stranoplodnje kod vinove loze 16
3.4 Poremećaji u oplodnji i razvoju dijelova bobice kod vinove loze. 16
3.4.1 Stenospermokarpija 17
3.4.2 Partenokarpija 19
3.4.3 Apomiksija 20
3.5 Utjecaj klijavosti peludi na proces oplodnje kod vinove loze 20
3.5.1 Fiziološka aktivnost polena 21
3.5.2 Slabija oplodnja kao posljedica klijavosti peludi 21
3.5.3 Morfološke i biološke karakteristike nefunkcionalne peludi 24
3.6 Kvaliteta grožđa i vina od besjemenih sorata 24
3.6.1 Fenoli u grožđu i vinu 26
4 MATERIJALI I METODE 32
4.1 Materijali 32
4.1.1 Sorte u istraživanju 32
4.1.2 Biljni materijal i tkiva 39
4.1.3 Pokusni nasadi 41
4.1.4 Klimatske prilike 42
4.2 Metode 48
4.2.1 Analiza sjemenih zametaka i ženskog gametofita 48
4.2.2 Analiza broja sjemenih zametaka kod sorta Grk, Plavac mali i Chardonnay 50
4.2.3 Dinamika razvoja bobica i zametaka sjemenke sorte Grk nakon oplodnje 50
4.2.4 Analiza građe peludi i klijavosti muškog gametofita 51
4.2.5 Određivanje kompatibilnosti sorata oprašivača i sorte Grk 52
4.2.6 Utjecaj udjela pasolina na kemijska svojstva grožđa i vina 54
4.2.7 Statistička analiza 56

5 REZULTATI 57
5.1 Izgled i veličina plodnica neposredno prije i nakon oplodnje 57
5.1.1 Građa sjemenog zametka i ženskog gametofita sorata Chardonnay, Plavac mali i Grk 59
5.2 Razvitak embrija sorte Grk 64
5.3 Razvitak embrija sorata Chardonnay i Plavac mali 66
5.4 Analiza broja sjemenih zametaka kod sorta Grk, Plavac mali i Chardonnay 67
5.5 Razvitak bobica i sjemenih zametaka sorte Grk nakon kontrolirane oplodnje 72
5.6 Analiza građe peludi i klijavosti muškog gametofita 82
5.6.1 Klijavost peludi sorte Chardonnay *in vitro* 82
5.6.2 Klijavost peludi sorte Plavac mali *in vitro* 85
5.6.3 Klijavost peludi sorte Grk *in vitro* 87
5.7 Određivanje kompatibilnosti sorata oprašivača i sorte Grk 90
5.7.1 Fenološka kompatibilnost potencijalnih sorata oprašivača i Grka 90
5.7.2 Utjecaj oprašivača na udio sjemenih bobica 90
5.8 Utjecaj udjela pasolina na kemijska svojstva grožđa i vina 93
5.8.1 Polifenolni sastav sjemenih bobica i pasolina 93
5.8.2 Kemijski sastav mošta i vina i organoleptičko ocjenjivanje vina 98
6 RASPRAVA I ZAKLJUČAK 106
6.1 Građa muškog i ženskog gametofita 106
6.2 Određivanje kompatibilnosti sorata oprašivača i sorte Grk 111
6.2.1 Fenološka kompatibilnost potencijalnih sorata oprašivača i Grka 111
6.2.2 Utjecaj oprašivača na udio sjemenih bobica 111
6.3 Utjecaj udjela pasolina na kemijska svojstva grožđa i vina 113
6.3.1 Polifenolni sastav sjemenih bobica i pasolina 113
6.3.2 Kemijski sastav mošta i vina i organoleptičko ocjenjivanje vina 115
7 POPIS LITERATURE 121
8 ŽIVOTOPIS 132

Popis slika: U prilogu; strana 1

Popis grafova: U prilogu, strana 3

Popis tablica: U prilogu, strana 3

1 UVOD

Vinova loza jedna je od prvih kultura koju je čovjek počeo uzgajati, a njezine plodove prerađivati i koristiti kao vino. Najstariji dokazi domestifikacije vinove loze potječu iz vremena neolitika (6000- 5000 g. pr. Krista) a nađeni su na istočnim obalama Crnoga mora. Prve dokaze o proizvodnji vina predstavljaju nađeni ostatci vinske kiseline i smole drveta za koju se zna da je služila za čuvanje vina. Ti ostatci nađeni su na području sjevernog Irana (nalazište Hajji Firuz) a datiraju iz vremena 5400- 5000 g. pr. Krista (Maletić i sur., 2008). Neke od najvećih svjetskih civilizacija bile su izrazito orijentirane na uzgoj vinove loze, a vino je predstavljalo jedan od najznačajnijih resursa u trgovinskoj razmjeni. Jedna od takvih civilizacija bila je antička Grčka. Grci su razvitkom i širenjem svoje civilizacije i kulture, te svojim snažnim trgovačkim utjecajem proširili kulturu uzgoja vinove loze i proizvodnje vina na cijelom području današnjega Mediterana. Izuzetak nije bila niti Hrvatska obala i otoci, o čemu postoje brojni arheološki dokazi o prisutnosti kulture uzgoja vinove loze, te proizvodnje i trgovine vinom. Nepobitan dokaz toga utjecaja je i današnja tradicija uzgoja vinove loze na svim većim hrvatskim otocima i obali. Na jednom od tih otoka, Korčuli uzgaja se sorta vinove loze Grk čije ime upućuje na drevnu povezanost hrvatske obale i antičke Grčke.

Grk je bijela sorta vinove loze koja se danas uzgaja pretežno u okolici Lumbarde na otoku Korčuli. Iako tek lokalno zastupljena, sorta posjeduje izvanredan kvalitativni potencijal. Potvrda kvalitete ove sorte za proizvodnju vina su višegodišnji rezultati proizvodnje u kategoriji vrhunskih vina nekolicine Lumbardskih proizvođača. Osim sa gospodarskog sorta je iznimno zanimljiva i sa znanstvenoga stajališta.

Naime, sorta Grk (Slika 1a) posjeduje funkcionalno ženski tip cvijeta (Mirošević, 2003) što je rijetkost za sorte unutar vrste *Vitis vinifera* L. koje dominantno posjeduje hermafroditan tip cvijeta (May, 2004). Kod loze postoje tri tipa cvijeta, najčešći je funkcionalno i morfološki dvospolni ili hermafroditni, drugi je morfološki dvospolan, a funkcionalno ženski, dok je treći muški tip cvijeta (Mirošević, 2003). Sva tri tipa cvijeta razlikuju se morfološki. Osnovna makroskopska razlika odnosi se na građu prašnika i tučka. Dok su kod funkcionalno i morfološki dvospolnog ili hermafroditnog cvijeta prašnici i tučak u potpunosti razvijeni i funkcionalni, kod ostala dva tipa javljaju se određeni stupnjevi deformacija prašnika ili tučka. Kod funkcionalno muškog tipa cvijeta prašnici su pravilno razvijeni i sadrže fertilna peludna zrna. Tučak kod takvih cvjetova je djelomično zakržljao ili je u potpunosti odsutan. Morfološki dvospolan a funkcionalno ženski cvijet sadrži i tučak i prašnike zbog čega se svrstava u morfološki hermafroditne tipove cvijeta.

Pelud kod ženskih cvjetova je sterilna pa se radi o funkcionalno ženskom cvijetu. Iako prisutni, prašnici kod ovakovog tipa cvijeta su nepravilno građeni. Nepravilna građa očituje se u vrijeme otvaranja cvijeta kada se prašničke niti povijaju prema cvjetnoj stapci a prašnice ostaju visjeti ispod cvjetišta. U prašnicama se razvija nefunkcionalna pelud. Tučak kod ovakovoga tipa cvijeta je pravilno razvijen i sadrži funkcionalno razvijene sjemene zametke.

Pojava funkcionalno ženskoga cvijeta kod sorata vinove loze u praktičnom smislu uvjetuje značajne probleme prilikom njihova korištenja u vinogradarstvu. Kako je pelud sterilna prilikom cvatnje nemože doći do procesa samooplodnje, embriogeneze i razvitka usploda. Proces samooplodnje je dominantan za većinu sorata vinove loze (May, 2004). Uslijed lošije oplodnje grozd sorata s funkcionalno ženskim tipom cvijeta ostaje rehuljav odnosno sa vrlo malim brojem bobica u grozdu, ili pak sa velikim udjelom malih nerazvijenih, besjemenih i često nezrelih bobica. Kako bi se osigurala kvalitetna oplodnja u proizvodnim nasadima potrebno je saditi sorte oprašivače, kod kojih se razvijaju fertilna peludna zrna. Sadnjom određenog broja jedinki sorata oprašivača unutar sklopa može se osigurati prihvatljiva oplodnja koja rezultira zametanjem dovoljnog broja oplođenih i normalno razvijenih bobica sa sjemenkom.

Pravilna oplodnja uvjet je za normalno formiranje i razvoj svih budućih dijelova bobice: sjemenke, usploda i kožice bobice. Sjemenka bobice razvija se iz sjemenog zametka unutar plodnice tučka. Ključni proces za pravilan razvoj sjemenke je dvostruka oplodnja tj. stapanje jezgre jedne spermalne stanice peludnog zrna i jajne stanice te jezgre druge spermalne s jezgrom središnje stanice embrionske vreće. Oplodnjom jajne stanice nastaje embrio koji predstavlja mikroskopski začetak buduće biljke unutar sjemenke (Drews i sur., 1998; Gifford i Foster, 1989; Walbot i Evans, 2003). Oplodnjom središnje jezgre pokreće se proces razvoja endosperma koji čini zalihu hranjiva za embrio. Ovojnice sjemenoga zametka razvijaju se u lupinastu ovojnicu sjemenke (May, 2004).

Pored važne reproduktivne uloge, pravilno formiranje i razvoj sjemenke ima neizostavnu ulogu u ukupnom razvoju bobice. Prilikom razvoja sjemenke u njoj se sintetiziraju hormoni koji potiču rast i razvoj cijele bobice. Ukoliko ne dođe do pravilnoga procesa oplodnje neoplođeni cvjetovi najčešće se suše i otpadaju, a na grozdu se razvija tek manji broj oplođenih sjemenih bobica zbog čega grozd ostaje rehuljav. Na rehuljavim grozdovima često se razvija i određeni broj bobica koje su ispodprosječno manjega volumena i mase te ne sadrže sjemenku ili je ona prisutna u vidu rudimenata. Male,

neoplođene, besjemene bobice rezultat su procesa stenospermokarpije ili partenokarpije (Pratt, 1971).

Stenospermokarpija je proces razvoja malih besjemenih bobica uslijed degeneracija u procesu razvoja embrija i sjemenke. U slučaju stenospermokarpije dolazi do normalne oplodnje i početnoga razvoja embrija, međutim u određenoj fazi razvoj sjemenke a time i razvoj bobice se zaustavlja. Proces partenokarpije podrazumijeva razvoj bobice bez oplodnje. Kod partenokarpije ne dolazi do spajanja gameta odnosno procesa oplodnje. Razvoj bobica ipak se počinje odvijati uslijed endogenih faktora unutar same biljke. Inicijaciju oplodnje u slučaju partenokarpije može potaknuti prisustvo peludi na njuškici tučka kao i spora mikroorganizama (Staudt, 1985).

Kod sorte Grk upravo je pojava takovih malih besjemenih bobica ono što ga pored funkcionalno ženskoga cvijeta čini specifičnim (Slika 1b i 1c). Unutar sortimenta Republike Hrvatske postoji još nekoliko sorata koje posjeduju funkcionalno ženski cvijet, kao npr.- Blatina crna, Cetinka bijela i Dišeća ranina bijela, međutim u praksi niti jedna od njih ne pokazuje tako visok stupanj pojave besjemenih bobica u masi grozda poput sorte Grk. Odnos udjela malih besjemenih bobica i onih oplođenih, velikih, koje sadrže sjemenku vrlo je varijabilan. Taj odnos može biti u potpunosti u korist normalno razvijenih bobica bez ijedne prisutne besjemene bobice ali i obratno, sa stopostotnim udjelom besjemenih, a bez i jedne oplođene bobice. Kako je prema Prattu (1971) pojava besjemenskih bobica u vinove loze uvjetovana dvama procesima, partenokarpijom ili stenospermokarpijom, tako je visoki udio besjemenih bobica osnova za hipotezu da kod Grka dolazi do jednog od ovih procesa.

Udio pojedinih bobica ne ovisi o poziciji grozda na mladici, trsu ili poziciji trsa u vinogradu. Međutim, kao i kod uzgoja ostalih sorata sa sličnim problemom, u nasadima sorte Grk prakticira se sadnja oprašivača kako bi se poboljšao udio normalno razvijenih sjemenih bobica. U vinogradima na otoku Korčuli tradicionalno se kao oprašivač sadi sorta Plavac mali, međutim niti njegova prisutnost u praksi zbog nepoklapanja u vremenu cvatnje sa sortom Grk ne garantira visoki postotak oplodnje. Iako izbor kvalitetnog oprašivača u značajnoj mjeri može poboljšati oplodnju (May, 2004), navedeni utjecaj oprašivača na stupanj oplodnje kod sorte Grk do sada nije bio predmet znanstvenog istraživanja. Ispitivanje potencijalnog oprašivača mora uključiti nekoliko bitnih faktora, kao što su podudarnost u vremenu cvatnje među sortama, klijavost peludi sorte oprašivača, ali i regionalno značenje i tehnološke karakteristike sorte oprašivača.

Pojava besjemenih bobica u grozdu može promijeniti i kvalitativne karakteristike grožđa, odnosno mošta, a time i vina. Brojna istraživanja potvrđuju da zbog drugačijeg

odnosa mesa i kožice kod besjemenih bobica postoje više koncentracije pojedinih spojeva, posebice šećera i organskih kiselina (Preiner i sur., 2012), ali i polifenolnih spojeva (Ramchamadni, 2010).

Jedna od pretpostavki da bi male besjemene bobice mogle imati utjecaj na kvalitetu vina kod sorte Grk upravo je i njegovo ime. Kao jedna od teza porijekla imena Grk je i riječ „gark“ koja u lokalnom govoru ima značenje „gorak“. Naime, vino ove sorte u svom okusu posjeduje specifičnu gorčinu. Ranijim radovima dokazano je da male besjemene bobice posjeduju veću količinu organskih kiselina (Preiner i sur., 2012) zbog kojih se u vinu može javiti pojačan osjet gorčine. Međutim, do sada nije istraživan sadržaj polifenolnih spojeva u grožđu sorte Grk, od kojih se neki jasno dovode u vezu organoleptičkim osjetom gorčine vina (Kennedy, 2008).



Slika 1. Sorta Grk (Vitis vinifera L.). ***(a)*** *Grozdovi sorte Grk u vrijeme fenofaze šare.* ***(b)*** *Grozdovi sa različitim udjelom pojedinih vrsta bobica neposredno prije fenofaze šare: grozdovi sa najvećim udjelom velikih sjemenih bobica (desno) i malih besjemenih bobica (lijevo) lokalnog naziva „pasoline“.* ***(c)*** *Velike, sjemene bobice (plavo) i male besjemene bobice „pasoline“ (zeleno) u vrijeme pune zrelosti.*

2 HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Poznavanjem morfološke građe cvijeta sorte Grk, praktičnih problema u proizvodnji te literaturnim podacima može se postaviti nekoliko hipoteza:

- Besjemene bobice sorte Grk mogu nastati bez oplodnje, ali i nakon oplodnje, kada dolazi do prekida razvitka embrija u ranim fazama embriogeneze i posljedičnog propadanja sjemenih zametaka.
- Pelud sorte Grk je sterilan zbog morfoloških karakteristika zrnaca ili opadanja vijabilnosti.
- Potencijalni oprašivači nemaju jednaku klijavost peludi, te njihova prikladnost ne ovisi samo o fenološkim karakteristikama sorte.
- Veći udio besjemenih bobica značajno utječe na kemijska i senzorna svojstva vina cv. Grk.

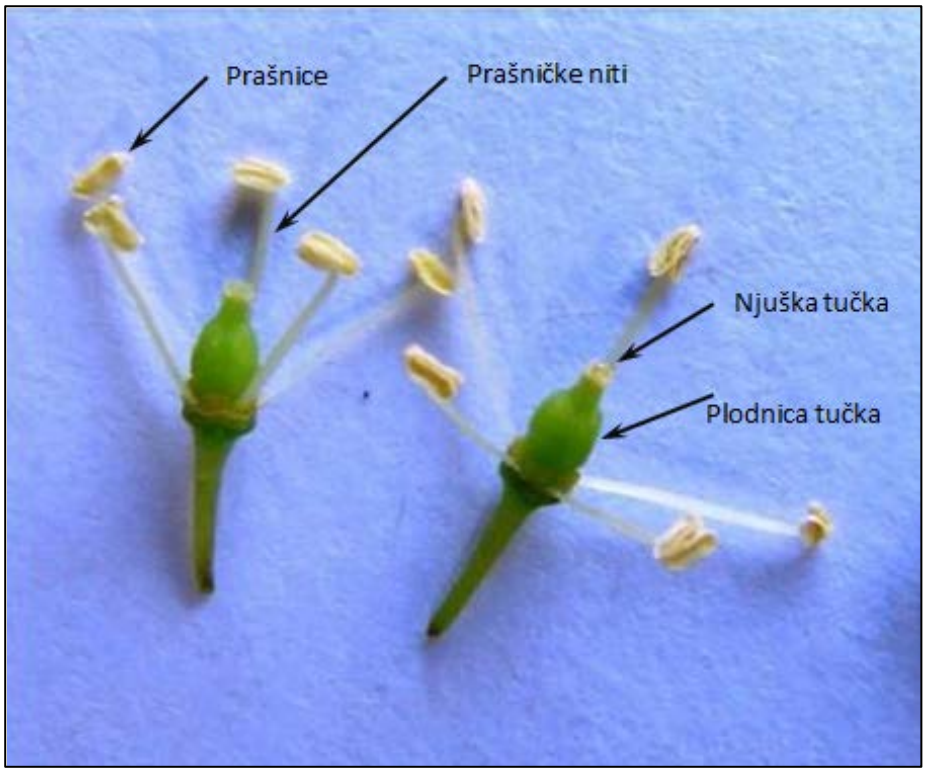
Ciljevi istraživanja su:

- Razviti tehnike analize ženskog gametofita vinove loze na temelju mikroskopije i/ili mikromanipulacije;
- Mikroskopskima analizama sjemenih zametaka definirati poziciju i zrelost ženskog gametofita (embrionske vreće) te pojedinih stanica unutar embrionske vreće prije oplodnje, te razvijajućih embrija nakon oplodnje;
- Usporediti odstupanje razvitka ženskog gametofita sorte Grk prije i poslije oplodnje s nekoliko visoko fertilnih sorata (Plavac, Chardonnay i sl.);
- Utvrditi razloge pojave besjemenih bobica analizama sjemenog zametka i ženskog gametofita;
- Utvrditi razloge autoinkompatibilnosti (nemogućnost samooplodnje) ove sorte kroz analizu uspješnosti mikrogametogeneze, morfologije peludnog zrna te procjene klijavosti peludi *in vitro*;
- Utvrditi fenološku kompatibilnost nekoliko izabranih sorata (Plavac mali, Pošip, Chardonnay), te utvrditi klijavost njihova peludi *in vitro* i postotak oplođenih bobica sa sjemenkom *in vivo*;
- Utvrditi u kojoj mjeri i kako udio neoplođenih, malih besjemenih bobica utječe na kemijska svojstva grožđa (sadržaj šećera, ukupna kiselost, pH, sadržaj ukupnih i pojedinačnih fenola) i vina (osnovne kemijske karakteristike, te senzorna ocjena) cv. Grk.

3 PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

3.1 Građa hermafroditnog cvijeta vinove loze

Vidljivu vanjsku građu cvijeta vinove loze čine cvjetna stapka, cvjetna loža, cvjetna čaška, lapovi, latice, prašnici koji se sastoje od prašničkih niti i prašnica, te tučak koji se sastoji od njuškice, vrata tučka i zadebljale baze koja predstavlja plodnicu (Slika 2). Cvijet je cvjetnom stapkom povezan sa cvatnom osnovom na ogranku peteljke. Na vrhu cvjetne stapke nalazi se cvjetna loža. Na cvjetnoj loži formirani su dijelovi cvijeta koji su raspoređeni u koncentričnim krugovima (Pratt, 1971). Prvi krug na cvjetnoj loži čini cvjetna čaška koja se sastoji od pet sraslih lapova. Sljedeći red predstavljaju latice. Latice su srasle na bočnim rubovima i na vrhu, te na taj način čine cvjetnu kapicu ispod koje se nalaze prašnici i tučak. Cvjetna kapica predstavlja mehaničku zaštitu za prašnike i tučak do trenutka cvatnje i otvaranja cvijeta. Nakon što u vrijeme cvatnje cvjetna kapica otpadne, na cvijetu postaje uočljivo pet koncentrično raspoređenih prašnika i jedan tučak.



Slika 2. Građa hermafroditnog cvijeta kod vinove loze

3.1.1 Građa tučka

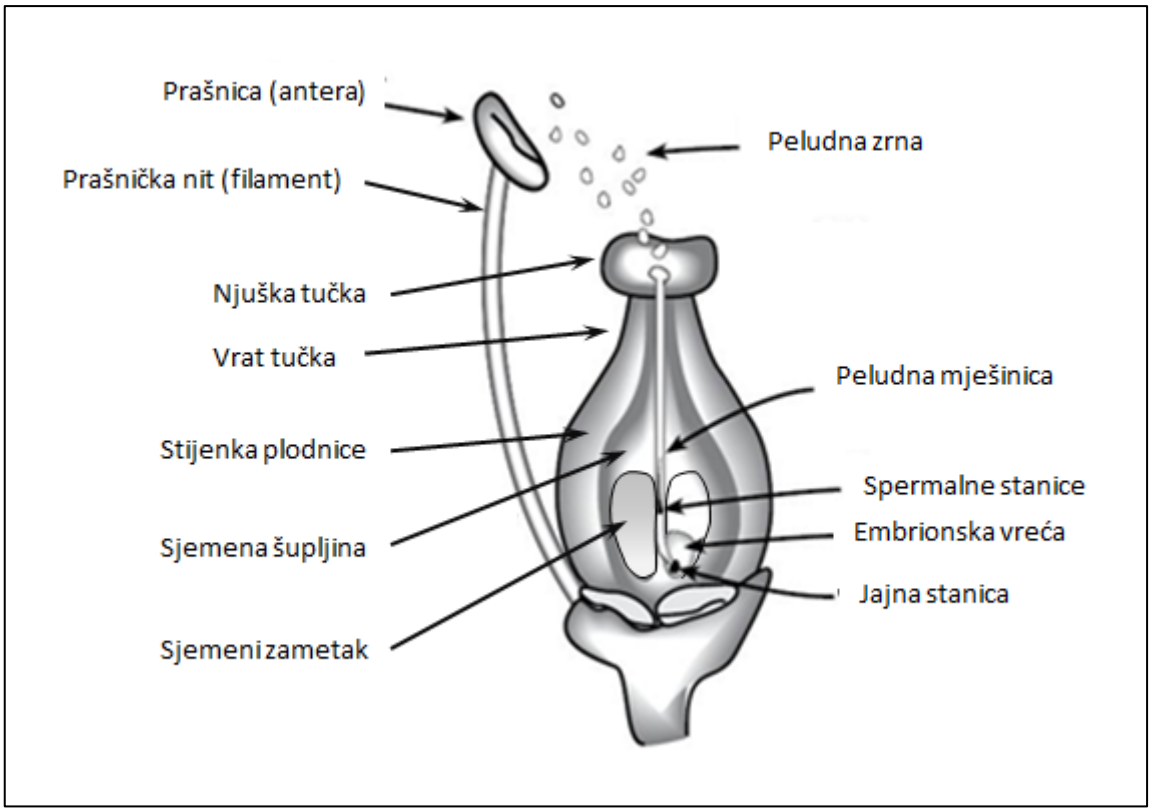
Diferencijacija tučka u procesu formiranja cvijeta počinje nakon diferencijacije lapova, latica i prašnika tj. prati redoslijed razvoja od vanjskih dijelova cvijeta prema unutarnjima. Tučak je kruškolikog oblika. Na njegovom samom vrhu nalazi se njuškica tučka, u vidu ispupčenog proširenja. Ispod njuškice nastavlja se vrat tučka, izduženi i suženi dio između njuškice i plodnice. Plodnica tučka, ovalnog je oblika i nalazi se unutar cvijetne čaške. Tučak je sa morfološkog stajališta građen od dvaju spojenih karpelnih listića (Pratt, 1971). (Slika 3)

Njuškica tučka ima najvažniju ulogu kod prihvata peludi. Površina njuškice tučka sastoji se od mnoštva papila koje služe boljem prihvatu peludovih zrnca. U odgovarajućim klimatskim prilikama na površini njuškice tučka izlučuje se sekret koji omogućuje bolji prihvat peludi ali i osigurava povoljne uvjete za njegovo klijanje. Točan kemijski sastav sekreta nije poznat, međutim kao glavni sastav navode se fruktoza i glukoza,- a u osnovi ga predstavlja emulziju šećera, masti, fenolnih spojeva i polisaharida (Gartel, 1956., preuzeto iz May, 2004). Njuškica tučka postaje vlažna u trenutku kada je cijeli tučak spreman za oplodnju (Considine i Knox, 1979; Ciampolini i sur., 1996; preuzeto iz May, 2004). U uvjetima suhoga i vrućeg vremena sekret se ne izlučuje a njuškica tučka se suši što znatno otežava proces oprašivanja. Vrat tučka vinove loze građen je od dva srasla karpelna listića te ima funkciju u osiguravanju prolaska peludne mješinice koja muške gamete prenosi do ženskog gametofita. Središnji dio vrata tučka ispunjen je posebnim tkivom koje se naiva transmisijsko tkivo (Sartorius 1926, Ciampolini 1996; preuzeto iz May, 2004), a kroz koji se odvija klijanje peludne mješinice. Transmisijsko tkivo građeno je od šest slojeva stanica, a klijanje peludi odvija se kroz međustanične prostore tri unutarnja sloja stanica koji su ispunjeni matriksom sličnoga sastava kao i onaj na njuškici tučka (Pratt, 1971). Peludna mješinica nakon prolaska kroz tkivo vrata tučka i ulaska u plodnicu klije dalje prema sjemenom zametku, prvo kroz funikulus nakon čega zakreće do mikropile (Pratt, 1971). Nakon prolaska kroz mikropilu signali izlučeni od strane ženskog gametofita izazivaju pucanje peludove cijevi, oslobađanje spermalnih stanica koje se dalje usmjeravaju prema ženskim gametama te slijedi proces oplodnje.

Plodnicu tučka čine stjenke, sjemene šupljine te sjemeni zametci (Slika 3). Stjenke su građene od epiderme od tankoga sloja parenhimskih stanica. Sjemene šupljine nastaju procesom spajanja vanjskih rubova karpelnih listića, a nastalo tkivo kojim su rubovi listića vezani naziva se septum. Septum unutrašnjost tučka razdvaja na dvije šupljine. Unutar svake sjemene šupljine nalaze se dva sjemena zametka. Sjemeni zametci unutar sjemenih šupljina odvojeni su septumom u vlastite komorice tako da je cijela unutrašnjost

tučka u konačnici podijeljena na četiri komorice sa po jednim sjemenim zametkom u svakoj (Pratt, 1971).

Njuška i vrat tučka imaju samo receptivnu i transportnu ulogu tijekom procesa oplodnje a nakon oplodnje se suše. Plodnica i sjemeni zametak ostaju prisutni tijekom čitavog perioda razvoja nakon oprašivanja i oplodnje te se razvijaju u bobicu i sjemenku. Pri bazi tučka nalaze se i nektariji, koji su u pravilu razvijeniji kod vrsta sa muškim tipom cvjeta (Pratt, 1971).



Slika 3. Shematski prikaz unutrašnjosti plodnice tučka tijekom procesa oplodnje

3.1.2 Razvitak sjemenih zametaka i ženskog gametofita

Sjemeni zametci predstavljaju prekursore razvoja sjemenke (Endress i sur., 2011). Glavni dijelovi sjemenog zametka su nucelus i integumenti odnosno sjemene ovojnice (ovojni listovi), halaza, funikulus, te otvor mikropile.

Sjemeni zametci počinju se formirati sa unutarnje površine karpelnih listića (Endress, 2006.). Početak rasta kao i kod ostalih organa kreće iz primordija. Primordij nastaje diobom stanica iz jednoga ili dva subepidermalna sloja na bazi sjemene šupljine (Endress i sur., 2011). Mjesto na primordiju sjemenog zametka na kojem počinje inicijacija integumenata naziva se halaza. Blizu vrha halaze nastaju dva primordija iz kojih se kasnije razvijaju vanjski i unutarnji integumenti. Unutarnji integument raste periklinalnom diobom stanica i obično se brže razvija od vanjskoga (Endress, 2006). Prema Prattu (1971) unutarnji integument sastoji se od dva ili tri sloja stanica. Središnji sloj stanica unutarnjeg integumenta formira endostomu (zadebljanje oko mikropile). Stanice vanjskog sloja unutarnjeg integumenta formiraju kutikulu. Stanice unutarnjeg sloja sadrže mnogo tanina. Vanjski integument se razvija periklinalnom diobom iz epidermalnih stanica pri bazi unutarnjeg integumenta. On je građen od dva do pet slojeva stanica, a na dijelu uz halazu i devet slojeva. Na vrhu integumenata nalazi se halaza. Vanjski sloj vanjskog integumenta također sadrži tanine. Ostali slojevi čine vezu između epiderme plodnice i sjemenog zametka. Razvoj vanjskoga inegumenta može slijedi razvoj unutarnjega, ali može doći i do promjena u njegovoj strukturi, prilikom čega on može ostati nepotpuno razvijen (Endress i sur., 2011).

Prema Endress i sur. (2011) sjemeni zametci se s obzirom na poziciju unutar sjemene šupljine, kod nekih vrsta pozicioniraju uspravno bez rotacije po uzdužnoj osi dok se kod drugih tijekom razvoja zarotiratiraju po uzdužnoj osi. Kod ovih zadnjih ustvari dolazi do rotacije polova pri čemu je mikropila (mjesto gdje se krajevi integumenta dodiruju) prislonjena na tkivo placente a halaza je okrenuta prema unutrašnjosti sjemene šupljine. Kod oba tipa sjemenih zametaka nucelus može biti ravan ili zakrivljen. Uspravni sjemeni zameci čiji je nucelus ravan pripadaju grupi ortotropnih a zakrenuti sjemeni zametci sa također ravnim nucelusom grupi anatropnih. Zakrivljeni sjemeni zametci mogu biti monosimetrični ili asimetrični. Sjemeni zametci mogu biti i samo djelomično zakrivljeni (hemianatropni). Sjemeni zametak može biti vezan direktno na placentu (sjedeći tip) ili pričvršćen za placentu preko stapke, funikulusa (Bouman, 1984., preuzeto iz Endress i sur., 2011).

Diferencirani sjemeni zametci kod roda Vitis spadaju u skupinu anatropnog tipa (Pratt, 1971) te simetrični (Endress i sur., 2011).

Nucelus se razvija iz dijela sjemenoga zametka koji se nalazi iznad primordija unutarnjeg integumenta, a inicijacija njegovog razvoja vezana je uz inicijaciju razvoja integumenata. Ukoliko ne dođe do formiranja integumenata ne razvija se niti nucelus (Endress i sur., 2011.). Nakon završenog procesa diferencijacije sjemeni zametak je građen od nucelusa koji je obavijen sa dva integumenta.

Glavne razlike u građi sjemenog zametka kod svih vrsta predstavlja veličina sjemenog zametka, stupanj zakrivljenosti sjemenog zametka, debljina nucelusa, broj i debljina integumenata, formiranje mikropile, dužina funikulusa, stupanj vaskulizacije sjemenog zametka i razlike u histološkoj diferencijaciji (Endress i sur., 2011). Kod većine vrsta veličina sjemenog zametka je oko 0.5 mm dok ekstreme predstavljaju veličine od 0.15 mm ili preko 2 mm (Endress i sur., 2011). Debljina nucelusa (broj slojeva stanica iznad i oko mejocite) variraju od vrste do vrste. Normalan broj integumenata je dva, dok kod nekih vrsta postoji i jedan integument (Endress i sur., 2011.). Od ostalih specifičnosti autori navode da integumenti mogu biti urezani ili neurezani, dok vanjski može biti potpuno ili nepotpuno zaokružen („*cup-shaped*“). Mikropila može biti formirana između krajeva jednoga ili oba integumenta.

Sjemeni zametci pojavljuju se otprilike dva tjedna prije početka cvatnje (May, 2004). Unutar sjemenog zametka razvija se ženski gametofit, nazivan jos megagametofit, makrogametofit ili embrionska vreća**.**

Diferencijacija ženskoga gametofita odvija se u nucelusu koji predstavlja tkivo megasporangija (Endress i sur., 2011). Početak diferenciranja počinje procesom mejoze kojim se iz megasporocite formiraju četiri haploidne stanice - megaspore. Jedna od stanica megaspora razvija se u embrionsku vreću (megagametofit) dok ostale tri propadaju procesom programirane stanične smrti (Sundaresan i Alandete-Saez, 2010). Tijekom razvitka funkcionalna megaspora prolazi tri uzastopne mitoze te sadrži u konačnici osam jezgara (Christensen i sur., 1997; Evans i Grossniklaus, 2009). Ove mitoze nisu praćene citokinezom, te se jezgre na pravilan način raspoređuju unutar embrionske vreće. Četiri jezgre pozicionirane su na halazalnom a četiri na mikropilarnom kraju sjemenog zametka. Po jedna jezgra sa svakog kraja migrira u središte embrionske vreće, te se tamo fuzioniraju tvoreći diploidnu središnju jezgru (Sundaresan i Alandete-Saez, 2010). Nakon toga počinje citokineza kojom se formira zreli, sedmostanični ženski gametofit (Sundaresan i Alandete- Saez, 2010). Jedna od stanica je jajna stanica uz koju su vezane dvije stanice sinergide a nalaze se na mikropilarnom kraju sjemenog zametka (Kiesselbach, 1949). Sljedeća stanica je centralna stanica sa jednom diploidnom jezgrom. Na halazalnom kraju formiraju se tri stanice antipode. Upravo je ovakva građa embrionske

vreće unutar koje dolazi do tri mitotičke diobe najčešća kod kritosjemenjača, a ovako građeni sjemeni zametci se svrstavaju u *Poligonum* tip sjemenog zametka (Endress i sur., 2011). Ovakav tip sjemenog zametka karakterističan je i za vinovu lozu.

Unutarnji ili oba integumenta na svojim krajevima formiraju mikropilu, uski kanal kroz koji peludova mješica prolazi u nucelus, raste kroz nucelus, zatim do embrionske vreće i nakon toga kroz jednu od sinergida (Endress i sur., 2011). Nakon što peludova mjesinica prođe kroz sinergidu slijedi proces oplodnje prilikom čega se jedna spermalna stanica spaja sa jajnom stanicom a druga sa centralnom stanicom. Ovakav način oplodnje predstavlja dvostruku oplodnju.

Prema Carraro i sur. (1979), kod sorte vinove loze Verduzzo prilikom otpadanja kaliptre i spremnosti za oplodnju svi sjemeni zametci su normalnoga oblika i sadrže normalno razvijenu embrionsku vreću, dok je kod sorte Picolit „F“ kod koje dolazi do problema sa oplodnjom utvrđen postotak od 80% normalno razvijenih sjemenih zametaka dok 20% sjemenih zametaka sadržavalo nucelus bez embrionske vreće.

3.1.3 Građa prašnika

Prašnici se sastoje od prašničke niti ili filamenta te prašnice ili antere (Slika 3). Građu i razvoj tkiva u prašnicama opisali su Vasconcelos i sur. (2009). Prema navedenim autorima prašnica sadrži četiri peludove mješinice. Razvoj prašnica počinje iz arhesporijalne stanice. Diobom arhesporijalne stanice nastaje primarna parietalna stanica i primarna sporogena stanica.

Daljnjom diobom parietalne stanice formiraju se novi slojevi stanica koji formiraju tkivo prašnica. Nova tkiva se formiraju u sljedećem nizu (od epiderme prema unutrašnjosti): endotecij, srednji sloj stanica, tapetum - sadrži stanice sa dvije i više jezgara. Diobom primarne sporogene stanice nastaje majčinska stanice mikrospore. (Vasconcelos i sur. 2009)

Proces razvoja muškog gametofita (mikrogametofit ili peludno zrno) kod vinove loze opisan je također u radu Vasconcelos i sur. (2009). Prema navedenim autorima mejozom majčinske stanice mikrospore nastaju četiri haploidne mikrospore (stanice tetrade) koje ostaju u šupljini ispunjenoj hranjivom tekućinom. Jezgra mikrospora mitozom se podijeli na vegetativnu jezgru koja ima važnu funkciju tijekom procesa klijanja peludove cijevi i u generativnu jezgru. Generativna jezgra podijeli se mitotski još jednom, kod vinove loze netom prije procesa oplodnje te nastaju dvije spermalne stanice (May, 2004). Hranjivi

medij koji okružuje mikrospore tijekom sazrijevanja formira se degradacijom tapetuma i prisutan je u prašničkoj šupljini sve do faze sazrijevanja peludi i pucanja prašnica (Vasconcelos i sur., 2009). Pucanje prašnica ustvari predstavlja proces pucanja endotecija.

Kod sorata Grenache i Crignan na području južne Francuske u periodu od 27 dana nakon otvaranja zimskoga pupa kod vinove loze arhesporijalna stanica sadrži veću jezgru nego ostale stanice primordijalne antere. Mejoza u jezgrama majčinske stanice kod navedenih sorata događa se 16 dana prije otvaranja cvijeta (May, 2004.).

Svaka prašnica formira otprilike 4000 peludovih zrnaca što po cvijetu iznosi oko 20000 peludnih zrnaca. Tolika količinaa daleko premašuje brojku potrebnu za oplodnju čak i kod klijavosti od 5% (Wagner 1962., preuzeto iz May, 2004). Kelen (2003) kao najveću količinu peludi po jednom cvijetu kod sedam turskih sorata navode 9000 peludnih zrnaca (sorta Syah gemre) a najmanja 2906 peludnih zrnaca (sorta Syah dimrit).

Peludno zrno

Morfologijja peludnoga zrna vinove loze dobro je opisana u literaturi. Njegov oblik varira ovisno o sorti. Portele (1883) je uočio razlike u građi peludi te utvrdio da postoji eliptična pelud i ona okrugloga oblika (preuzeto iz May, 2004) no u većini slučajeva ono je eliptično-ovalnoga oblika. Na površini ovojnice (sporoderme) nalaze se tri brazde s porama (aperturama) kroz koje prolaze peludne mješinice u vrijeme klijanja.

Nekoliko morfoloških karakteristika peludi kao što su vanjski oblik, odnos promjera i dužine između polova, oblik brazdi, hrapavost površine u velikoj su mjeri svojstvo sorte. Iako su karakteristični za sortu, morfološki pokazatelji mogu biti isključivo dopuna ampelografskom opisu a nikako osnova za ampelografsku identifikaciju (Cabello i sur., 1994.).

Na promjenu navedenih karakterističnih svojstava peludi mogu utjecati okolišni uvjeti (Ahmedullah i sur. 1981; Linder i Linskens, 1978. preuzeto iz May, 2004).

Prema Chkhartishvili i sur. (2006) mjerenjem na nekoliko sorata dužina peludi kretala se između 28,4 i 35 µm, širina 14,7 do 17,2 µm a opseg širine 18,1 do 24,4 µm. Slične vrijednosti navodi i Oberle (1938) pri čemu je pelud kod vinove loze dužine 25-30 µm a širine 12-15 µm. Isti autor također navodi da fertilna pelud ima oblika bačve dok je sterilna ovalnog oblika (preuzeto iz Vasconcelos i sur., 2009) .

Kod dvodomnih vrsta iz roda *Vitis,* kao što je primjerice vrsta *Vitis coignetiae* postoje morfološki dva tipa peludi. Pelud iz prašnica muških cvjetova na svojoj površini

sadrži tri brazdice simetrično položene na površini peludi pri čemu svaka brazdica sadrži poru za klijanje peludi (aperturu) na ekvatorijalnoj strani peludi (eng.- *„tricolporated pollen grains*“) (Kimura i sur., 1997.). Isti autori su utvrdili i morfološku građu drugoga tipa peludi porijeklom iz zakržljalih prašnica sa ženskog tipa cvijeta. Kod ovog tipa peludi utvrđeno je da na površini ne postoje brazdice (eng.- „*acolporated pollen grains*“) te nedostaju strukture generativnoga aparata tj. aperture za klijanje. Također isti autori navode da je i produkcija peludi puno manja kod ove (dvodomne) vrste (oko 2000 zrnaca po anteri) nego kod vrste *Vitis labruscae* cv. Portland koja spada u jednodomne vrste (4000 zrnaca po prašnici). Promjer peludi nakon dva sata rehidracije između triju vrsta iz roda Vitis, *Vitis coignetiae* (pelud sa muškog cvijeta), *Vitis labrusca* te *Vitis vinifera* cv. Cabernet sauvignon bio je otprilike isti (26 µm, 25,3 µm te 25,2 µm) bez utvrđene razlike usporedbom analize srednjih vrijednosti. Signifikantna razlika utvrđena je jedino kod peludi funkcionalno ženskog cvijeta *Vitis coignetiae* kod koje je promjer iznosio 26,7 µm. Za navedenu razliku također analizom srednjih vrijednosti nije utvrđena signifikantnost (Kimura i sur., 1997). Klijavost peludi testirane na više jedinki muških biljaka *Vitis coignetiae* na agarskom mediju bila je između 11,7 % i 34,3 % a prosječna duljina peludove cijevi bila je od 0,38 do 1,05 mm. Peludova zrnaca ženskih cvjetova nisu klijala. Klijavost peludi vrste *Vitis vinifera* cv. Muškat aleksandrijski iznosila je 48,9 % s prosječnom dužinom peludne mjesinice 1,27 mm (Kimura i sur., 1997).

Do pojave neklijave peludi uslijed morfološke građe može doći i u vrste *Vitis vinifera*. Tako Abreu i sur. (2006) potvrđuju da su u sorte Loureiro prisutna morfološki pravilna i nepravilna zrnca. Također navode da oba tipa zrnaca sadrže uz generativnu i vegetativnu jezgru, te da je citoplazma zrnaca gusta i bogata organelima. Abreu i sur. (2006) su utvrdili da je kod sterilne peludi plazmatska membrana nepravilnog oblika te na pojedinim dijelovima odvojena od sporoderme peludi. Vijabilnost peludi u navedenom istraživanju između oba tipa bila je također podjednaka (oko 60 %) dok je klijavost uočena samo kod pravilne peludi i iznosila je oko 80 % (Abreu i sur., 2006).

Sterilnost peludi može se javiti i kod peludnih zrnaca koje imaju normalnu građu sporoderme. Sterilnost je u tom slučaju posljedica poremećaja u diobi jezgre mikrosporocite (majčinske stanice mikrospore). Nepravilnosti u diobi jezgara događaju se tijekom procesa mejoze i javljaju se u različitim stupnjevima kod oba tipa peludi, i funkcionalnog i nefunkcionalnog **(**Da Silva, 2001). Sterilna pelud kod sorata sa ženskim cvijetom pokazuje dodatno i post-mejotičke nepravilnosti kao npr. degeneraciju generativne ili vegetativne jezgre ili pak obiju jezgara, te odsustvo sekundarne mitotičke diobe (Da Silva, 2001).

Kod cvjetova sa sindromom tzv. „*star-flower*“ nepravilnosti se događaju u morfološkoj građi prašnica zbog čega one ne pucaju. Takve prašnice ujedno sadrže i visoki udio sterilne peludi. Prašnice koje ne pucaju pojavljuju se i kod nekih sorata koje posjeduju ženski cvijet (May, 2006).

U literaturi postoje i istraživanja građe jezgara i stanica muškog gametofita. Tako je prema Chkhartishvili i sur. (2006) vegetativna jezgra dvojezgrenog peludnog zrna ovalnoga oblika i pokazuje slabu reakciju sa tvarima za bojanje molekula DNA. Generativna jezgra je oblika leće, a jezgra pokazuje intenzivno obojenje reagensima za bojenje DNA (Chkhartishvili i sur., 2006).

3.2 Funkcionalno ženski cvijet

Ženski tip cvijeta predstavlja cvijet u kojemu je funkcionalan samo ženski gametofit. Takav tip cvijeta s morfološkog stajališta može biti hermafroditan jer sadrži prašnike i tučak ili morfološki ženski ukoliko su prašnici u potpunosti zakržljali. Najveći broj sorata vinove loze sa funkcionalno ženskim cvijetom posjeduje morfološki hermafroditni, a funkcionalno ženski tip cvijeta.

Ovakav tip cvijeta posjeduje normalan broj od pet prašnika, međutim prašničke niti su povijene u suprotnu stranu od centralne osi cvijeta. Prašnice se pritom nalaze ispod ili u razini cvjetne čaške. Unutar prašnica normalno se razvija sporogeno tkivo i stvara se normalan broj peludnih zrnaca koja nisu klijava (Vasconcelos i sur., 2009).

Sorte koje posjeduju ženski cvijet ovisne su o oprašivanju peludi porijeklom sa drugih sorata koje posjeduju klijav pelud. Stoga je potrebno u nasadima takovih sorata saditi trsove odgovarajućih hermafroditnih sorti radi što boljega oprašivanja, ili je nužno provoditi inducirano oprašivanje. Bohem (1960) sugerira da bi radi kvalitetnije oplodnje svaki treći red u nasadu sorte Ohanez trebao biti zasađen sortom hermafroditnog cvijeta Muscat Gordo (preuzeto iz May, 2004). Prema literaturi postoje i pokušaji induciranog oprašivanja vodenom otopinom peludi međutim takvi tretmani nisu dali rezultata. Razlog tome je nagli pad klijavosti peludi u vodi u roku od tri sata pa i manje u pripremljenoj vodenoj otopini (May, 2004).

3.3 Proces samooplodnje i stranoplodnje kod vinove loze

Općenito se smatra da je vinova loza biljna vrsta kod koje je dominantan način oplodnje samooplodnja. Navedena činjenica odnosi se na sorte sa normalno razvijenim hermafroditnim cvijetom koje čine većinu unutar vrste *Vitis vinifera*. Prema Antcliff-u (1980) kao posljedica stranooplodnje razvija se svega 1-2 % sjemenki.

Utjecaj samooplodnje i stranooplodnje kod vinove loze najviše je istraživan na primjeru stolnih sorata kod kojih postoji veliki broj besjemenih sorata, iako posjeduju morfološki hermafroditni tip cvijeta. Stupanj uspješnosti ispitivanja strano- i samooplodnje kod pojedinih sorata ispitivan je uz pomoć izolacije grozdova u vinogradu. Istraživanjem na gruzijskim sortama (Saperavi, Gorula i Gorula no. 21.) Chkhartishvili i sur. (2006) su utvrdili da se udio besjemenih bobica u grozdu kod izoliranih grozdova (inducirana samooplodnja) u vrijeme cvatnje kod većine sorata kreće između 3,5 – 7,3 %. Kod sorte Rkatsiteli pojava besjemenih partenokarpnih bobica nije uopće uočena, tako da se može zaključiti da je udio besjemenih nerazvijenih bobica unutar grozda kod fertilnih sorata u pravilu zanemariv.

Situacija je bitno drugačija kod sorata koje posjeduju ženski cvijet i kod kojih zbog nefunkcionalne peludi ne može doći do samooplodnje pa su im potrebne sorte oprašivači. Kao sorte oprašivači mogu služiti bilo one sa funkcionalno hermafroditnim tipom cvijeta ili funkcionalno muškim. Sabir i sur. (2011) su kod sorte Italija bijela utvrdili da nisu postojale signifikantne razlike u zametanju bobica i broju sjemenki po bobici između samooplodnje i stranooplodnje.

3.4 Poremećaji u oplodnji i razvoju dijelova bobice kod vinove loze.

Pojava nerazvijenih besjemenih bobica kod sorata vinove loze može biti izrazito izražena čak i potpuno dominanatana kod nekih sorata. Pojava nerazvijenih besjemenih bobica rezultat je poremećaja u oplodnji i embriogenezi, koji mogu biti posljedica fizioloških procesa u biljci kao što su partenokarpija, stenospermokarpija, muška sterilnost, nedovoljna ishranjenost biljke potrebnim hranjivima, itd. (May, 2004; Kimura i sur., 1997; Da Silva, 2001; Abreu i sur., 2006).

Ovisno o periodu kada dolazi do prestanka razvoja bobice ali i sjemenke pojedini autori napravili su i kategorizaciju. May (2000) je klasificirao bobice Chardonnay-a u sedam kategorija. Najveće bobice svrstane su u kategoriju 1 i zajedno sa kategorijama 2,

3 i 4 definiraju se kao normalne. Ove četiri kategorije u najvećoj mjeri definiraju ukupnu masu grozda. Kategoriju 5 čine one koje su puno manje od kategorije četiri ali i puno veće od kategorije 6. Bobice iz pete kategorije dozrijevaju i na taj način pridonose masi grozda. Kategorija 6 obuhvaća zelene, zakržljale bobice, a u zadnjoj kategoriji 7 nalaze se isušene, crne plodnice koje se drže na peteljčicama te ne otpadaju. Razlike u kategorijama bobica su povezane sa razlikama u sadržaju sjemenki. Broj sjemenki je reduciran od kategorije 1 do 4 za 30 %, 50 % odnosno 70 % dok je smanjenje težine bobice reducirano po istim kategorijama za 25 %, 40 % i 60 %. Male bobice iz kategoriju 5 imaju tragove sjemenki, dok u kategoriji 6 također postoje tragovi sjemenki čiji je razvoj prestao u ranoj fazi razvoja.

Cholet i sur. (1998) kod sorte Merlot, u kategoriju normalnih sjemenih bobica svrstaju one čiji je promjer u vrijeme berbe 15-17 mm. Kao besjemene bobice srednje veličine predstavljaju one od 4-7 mm, a male besjemene od 2-3 mm. U kasnijim istraživanjima isti autor (2002) navodi da je minimalna veličina za normalno oplođenu i razvijenu bobicu 9 mm.

Uzrok nepravilnog razvoja sjemenke unutar nerazvijene bobice ili njezinog potpunog propadanja je najčešće rezultat fizioloških procesa partenokarpije ili stenospermokarpije. Ove procese kao i općenito načine razvoja sjemenke unutar bobice opisao je Stout još 1936 godine.

3.4.1 Stenospermokarpija

Kod stenospermokarpnih sorata dolazi do normalnog procesa oplodnje i inicijalnog razvoja sjemenke, međutim u određenom trenutku taj se razvoj prekida a sjemenka ostaje zakržljala. Kod takvih sorata, s aspekta građe sjemenog zametka, utvrđeno je da do degeneracije dolazi prilikom diferencijacije razvijajućeg sjemenog zametka ili nakon oplodnje. Neke od degenerativnih promjena uključuju degeneraciju integumenata, nucelusa i embrionske vreće prije oplodnje, te degeneraciju embrija nakon oplodnje (Ledbeiter i sur., 1994; Korkutal, 2005; Carraro i sur., 1979). Stupanj degeneracije također varira.

Prema Stoutu (1936) kod sorata sa pojavom stenospermokarpije, ubrzo nakon procesa oprašivanja gotovo u svim sjemenim zametcima dolazi do slabog razvoja sklerenhimskog tkiva unutar integumenata ali i ostalih dijelova sjemenog zametka, što dovodi do nepotpunog razvitka sjemenke te pojave tragova sjemenki u tehnološki zrelim bobicama.

Kod nekih stenospermokarpnih sorata u određenom broju plodnica razvijaju se normalni sjemeni zametci dok se kod drugih javlja degenerativno razvijena embrionska vreća unutar normalno formiranoga nucelusa sa integumentima kao posljedica nepravilne gametogeneze (May, 2004). Olmo (1937) je utvrdio da su te abnormalnosti u građi sjemenog zametka vidljive jedanaest dana prije otvaranja cvijeta.

Propadanje sjemenke nakon oplodnje započinje otprilike 20 dana nakon otvaranja cvijeta (Coombe, 1959).

Kod nekih besjemenih kultivara endosperm i embrio propadaju, ali se integumenti nastavljaju normalno razvijati pa sjemenka u konačnici poprima specifičan oblik i konzistenciju. Unutrašnji dio sjemenke je uslijed nedovoljnog razvoja endosperma ispunjen zrakom te takve sjemenke uronjene u vodu isplivaju na površnu (eng. „floater seed“) (May, 2004; Ledbeiter, 1994).

Udio abnormalnih embrija veći je kod besjemenih nego kod sjemenih sorata (Pratt, 1971.).

Prema Korkutalu (2005) promjene u građi sjemenih zametaka kod sorte Baris u slučaju degradacije su sljedeće: kod plodnice unutarnji i vanjski integument se ne razvijaju i ne sadrže sklerenhimsko tkivo u središtu što uzrokuje degradaciju stanica integumenata. Sedam dana nakon cvatnje mikropila i unutarnji integument ostaju otvoreni a petnaest dana nakon pune cvatnje integumenti i endosperm degradiraju uslijed čega sjemenka ostaje naborana i smežurana. Potpuno propadanje sjemenke utvrđeno je nakon 15 dana, međutim bobica se nastavlja razvijati**.**

U kasnijim fazama razvoja embrio je prisutan samo u razvijenijim bobicama, a maksimalni stupanj razvoja embrija ide najdalje do globularnoga stadija (Pratt, 1971).

Struktura degeneriranih sjemenki u zreloj bobici može biti različita, od jedva vidljivih nakupina tkiva preko mekanih blijedih jastučića do djelomično odrvenjelih začetaka sjemenke tamne boje. Kod sorte Sultanina sjemeni zametci koji se razvijaju do te faze da se na presjeku bobice mogu raspoznati kao rudimenti sjemenke. Njihovi integumenti su mekani ali sadrže smeđe obojenje zbog čega su uočljivi (May, 2004).

Pelud stenospermokarpnih kultivara smatra se u pravilu klijavom. Oprašivanje je općenito potrebno, ali postoji tendencija pojave zametanja bobica bez oplodnje, pogotovo nakon prstenovanja stabljike (Pearson, 1933; Stout, 1936; preuzeto iz Pratt, 1971).

Sa ciljem povećanja bobica stenospermokarpnih sorata u praksi se koriste ampelotehnički zahvati prstenovanja ili tretiranje hormonima.

3.4.2 Partenokarpija

Kod partenokarpije, za razliku od stenospermokarpije uopće ne dolazi do procesa oplodnje a razvoj bobice potaknut je nepoznatim fiziološkim poticajem unutar same biljke ili pak kontaktom njuškice tučka sa peludom (stimulativna partenokarpija) (Pratt, 1971). Kod oba tipa nakon početnog induciranoga razvoja sjemenke dolazi do propadanja.

Kod sorata kod kojih se javlja partenokarpija (Black Corinth) postoje dva tipa propadanja sjemenih zametka, jedan prije, a drugi nakon megasporogeneze (Pratt i sur. 1971). Sorta Black Corinth pripada prvoj kategoriji. U tom slučaju sjemeni zametci nisu građeni anatropno i sadrže samo jedan integument. Dio nucelusa izlalzi kroz mikropilu prema van te se savija, dok je unutarnji dio nucelusa unutar integumenata uništen. Razvoj embrionske vreće je nepotpun, zaostaje u različitim fazama ili njezino formiranje potpuno izostaje. Halaza je djelomično nekrotizirana. Međutim, kod ove sorte ipak dolazi do zametanja plodova, ali oni tijekom kasnijeg razvoja ostaju mali i nedovoljno razvijeni (Antcliff, 1967).

Drugi tip propadanja podrazumjeva normalno razvijene integumente i nucelus, ali do propadanja dolazi nakon što se formira megaspora ili nakon što degenerira embrionska vreća (Corinto bianco) (Pratt i sur., 1971).

Prema Prattu (1971) građa sjemenih zametaka odnosno začetaka sjemenki u zrelim bobicama je sljedeća: sjemeni zametci su maleni, samo sa jednim slojem sklerenhimskih stanica u vanjskom integumentu te ne dolazi do ruminacije. Povremeno se može naći veća tvrda sjemenka koja ima jedan ili više slojeva sklerenhima. Kod takvih sjemenki dolazi do procesa ruminacije, nucelus se povećava i ostaje pravilne građe, međutim embrionska vreća je nefunkcionalna.

Pelud partenokarpnih sorti klija slabo, uopće ne klija (Corinth) ili je pak vrlo vijabilan (Black Corinth) (May, 2004). Kod partenokarpne sorte Black Corinth, Olmo (1937) je utvrdio da oprašivanje daje rezultate samo ako je kombinirano s prstenovanjem (preuzeto iz May, 2004). To je pak bilo u suprotnosti s istraživanjem Antcliff-a (1967) gdije prstenovanje nije bilo neophodno te je i bez njega ipak je došlo do oprašivanja (preuzeto iz May, 2004).

3.4.3 Apomiksija

Apomiksija je u kritosjemenjača definirana kao i razvoja embrija unutar sjemenke bez prethodne oplodnje. Prilikom apomiksije embrio otpočinje razvitak iz stanica majčinskog sporofita koje nisu produkt mejoze a imaju potencijal embriogenog razvitka bez oplodnje (Koltunow i sur. 1995; Bicknell i Koltunow 2004). Ovaj proces opisan je kod više od 400 vrsta cvjetnica unutar 40 rodova (Carman, 1997). Od ukupnog broja spomenutih vrsta 75 % ih pripada u tri roda, *Asteraceae, Rosaceae i Poaceae*.

Diplosporija i aposporija predstavljaju mehanizme apomiksije koje opisujemo pojmom gametofitne embriogeneze. Pri ovim procesima razvoj embrija induciran je bilo iz stanice koja se diferencira kao majčinska stanica megaspore (arhesporijalne stanice) (diplosporija) ili iz njoj susjednih stanica nucelusa (aposporija) (Schmidt i sur., 2015). U oba slučaja ne dolazi do mejoze već se embrio razvija isključivo mitotičkom diobom unutar nereducirane embrionske vreće. Kako bi došlo do razvoja endosperma u pravilu je potrebna oplodnja dok kod manjeg broja apomiktičnih vrsta oplodnja nije potrebna. Suprotno od ovih procesa, adventivna embrionija predstavlja mehanizam razvoja embrija somatskom embriogenezom iz stanica nucelusa ili integumenata koja se nalaze u blizini normalno razvijene embrionske vreće. Razvoj i uspješnost preživljavanja ovakvih adventivnih embrija ovisi o razvoju endosperma nakon dvostruke oplodnje.

3.5 Utjecaj klijavosti peludi na proces oplodnje kod vinove loze

Uspješnost oplodnje ovisi o brojnim faktorima vezanima za karakteristike peludi. Među najbitnije faktore spadaju morfološke i fiziološke karakteristike peludi. Od morfoloških karakteristika najviše pažnje posvećuje se građi sporoderme peludi i pravilnog procesa diobe jezgre. Fiziološke karakteristike peludi su klijavost i fiziološka aktivnost. Kod sorata sa funkcionalno ženskim cvijetom kao i kod nekih sorata sa hermafroditnim cvijetom utvrđeni su poremećaji u građi stijenke peludi i jezgara peludnog zrna. Zbog navedenih promjena pelud takovih vrsta je u potpunosti sterilna zbog čega ne dolazi do oplodnje.

Međutim i kod peludi normalne građe i fiziološke aktivnosti mogu postojati izražene razlike u stupnju odnosno postotku oplodnje. U pojedinim okolišnim uvjetima stupanj oplodnje može značajno varirati ovisno o sorti. Od okolišnih uvjeta koji utječu na klijavost peludi najznačajniji su temperatura, količina padalina, te intenzitet strujanja zraka (vjetar). Osim okolišnih uvjeta jedan od bitnih faktora koji utječu na klijavost su i fiziološki čimbenici

unutar same biljke. Od unutarnjih faktora bitni su stupanj ishranjenosti biljke pojedinim hranjivim elementima, stres uslijed nedostatka vode, izbor podloge, mutacije, itd. Lošiji klimatski uvjeti (previsoke ili preniske temperature) ili nedostatak esencijalnih hranjivih elemenata posebice bora i magnezija može uzrokovati slabiju klijavost peludi. U tom slučaju krajnje posljedice mogu biti lošija oplodnja i izostanak kvalitetnog uroda grožđa.

3.5.1 Fiziološka aktivnost polena

Fiziološka aktivnost polena utvrđuje se analizom broja i aktivnosti jezgara muškog gametofita u matriksu peludnog zrna. Metode kojim se utvrđuje fiziološka aktivnost peluda i broj jezgara je bojanje razlicitim vijabilnim bojama ili bojama s afinitetom prema DNA. Bojanjem jezgara utvrđuje se njihovo postojanje i broj. Peludno zrnce kod kojeg dolazi do pravilnoga obojenja i koje sadrži pravilan broj jezgri (dvije spermalne i jednu vegetativnu) smatra se zrelim i sa citogenetičkog stajališta spremnim za oplodnju. Bojanje vijabilnim bojama dokazuje fiziolosku aktivnost. Istraživanjem na sedam turskih sorata (Kelen, 2003) utvrđeno je da je udio aktivne peludi između 23,8 i 80,8 metodom bojenja bojom FDA (od eng. fluorescein diacetat) te 31,5 % i 68,8 % metodom bojenja bojom TTC (2,3,5-trifenil tetrazolium klorid). Testiranjem klijavosti peludi u istraživanju Kimura i sur. (1997) utvrđeni su postoci obojenog peludi (metoda bojenja acetokarminom) kod vrsta *Vitis coignetiae* (pelud s muškog cvijeta), *Vitis labrusca* te *Vitis vinifera* cv. Cabernet sauvignon. Utvrđeni postotak obojenih zrnaca navedenih vrsta iznosi redom 88.4 %, 82,7 %, 84 % te 93,6 % za pelud sa ženskog cvijeta *Vitis coignetiae*.

3.5.2 Slabija oplodnja kao posljedica klijavosti peludi

Ispitivanje klijavosti peludi *in vitro* važno je iz aspekta utvrđivanja morfoloških i fizioloških obilježja procesa klijanja. Iako se *in vitro* testiranjem utvrđuju relativno veliki postoci klijavosti peludi, u prirodi je dovoljno da na nekom cvijetu dođe do klijanja samo jednog peludnog zrnca od njih više tisuća iz jedne prašnice i proces oplodnje može se smatrati mogućim. Klijavost peludi u *in vitro* uvjetima od 50 do 70 % smatra se normalnom, međutim mnogi faktori (genetski, fiziološki, utjecaj okoliša) mogu značajno utjecati na taj postotak (May, 2004). Stupanj klijavosti peludi *in vitro* od 10 % smatra se minimalnim za uspješnu oplodnju *in vivo* (Mayer, 1964)

Kod istraživanja klijavosti peludi *in vitro* prate se faktori temperature okoline, vrijeme naklijavanja, sastav hranjivog medija te eventualni period i temperatura prilikom čuvanja peludi prije samog naklijavanja.

Prema istraživanju Sharafi i sur. (2011) na iranskim sortama utvrđen je postotak klijavosti između 23,6 % i 83,1 %, pri čemu je kod većine kultivara bio iznad 80% prilikom naklijavanja odmah nakon uzimanja uzoraka. Dužina peludove cijevi varirala je između 86,2 do 538,2 µm.

Dužina peludnih mješinica ovisna je o vremenu klijanja i temperaturi, pa tako Staudt (1985) navodi prosječnu dužinu peludne mješinice od 2408 µm nakon 48 sati na temperaturi od 28 ^{0}C. Utvrđena klijavost peludi nakon 48 sati tretmana pri različitim temperaturama, 2 ^{0}C, 5 ^{0}C, 10 ^{0}C iznosi 2502 µm, 2145 µm odnosno 2265 µm 10 ^{0}C (nakon 48 sati naklijavanja na 28 ^{0}C). Ovi rezultati dokaz su da se kratkotrajnim čuvanjem peludi na niskim temperaturama njegova klijavost značajno ne smanjuje. Bronner i Wagner (1997) ispitivali su klijavost peludi sedamdesetak sorata kroz dvije godine na području Australije (preuzeto iz May, 2004). Ovisno o sorti prosjek je varirao između 5 % i 90 %. Kod najvećeg broja sorata klijavost sorata u navedenom istraživanju iznosi između 30 i 70 %. Isti autori navode važnost klimatskih prilika tijekom različitih sezona na klijavost sorata. Kod sorte Aris klijavost je u prvoj sezoni istraživanja iznosila je 38 % a u drugoj svega 2%. Time su autori dokazali da su okolišni uvjeti bitan faktor koji utječe na klijavost peludi.

Utjecaj okolišnih uvjeta kao i ampelotehničkih postupaka na klijavost peludi istraživao je Mirošević (1981). Istraživanja su provedena na vinogradarskom području grada Zagreba, a odnosila su se na ispitivanje utjecaja piniciranja i folijarne prihrane na klijavost peludi *in vitro* i *in vivo*. U *in vivo* uvjetima kod izoliranih grozdova najmanja klijavost utvrđena je kod kontrolne varijante na kojoj nisu primijenjeni nikakvi tretmani (19,5 %- 19,02 %). Nešto bolji ali približno jednaki udio imale su varijanta sa folijarnom prihranom (22,7 %- 21,54 %) i varijanti sa piniciranjem (22,65 %- 20,65 %). Najbolju klijavost imala je varijante kod koje je izvedeno i piniciranje i prihrana borom i kretala se između 26,16 % i 23, 78 %. Najveći postotak klijavosti u in vitro uvjetima postignut je nakon 24 sata i to maks. 19.76 % kod kontrole do maks. 24,14 % kod kombinacija tretmana. Također utvrđen je visoki korelacijski koeficijent između klijavosti peludi in vivo: in vitro nakon 12 h (0,57-0,68) te in vivo: in vitro 24 h (0,72-0,77) (Mirošević, 1981).

Hranidbeni status biljke odnosno medija na kojem se odvija klijanje ima važnu ulogu za klijanje peludi. Esencijalnu ulogu u klijanju peludi ima element bor što je još 1935. otkrio Schmucker (preuzeto iz May, 2004). Borna kiselina dodana u koncentraciji od 100 mg/l djeluje stimulativno dok koncentracije veće od 1 g/l djeluju inhibirajuće (Mayer, 1964; Dornic i sur., 1970; preuzeto iz May, 2004). Dodani zajedno sa borom pozitivno na klijanje peludi djeluju i magnezij i kobalt. Bakar, cink i kobalt bez dodatka magnezija i bora

djeluju negativno i na klijanje peludi i na kasniji rast peludove cijevi (May, 2004). Vitamini tiamin (10 mg/l) i biotin (5-10 mg/l) poboljšavaju postotak klijanja (Bronner i Wagner, 1997.; preuzeto iz May, 2004). Kao najbolji sadržaj medija za *in vitro* klijanje peludi navodi se medij s 20% saharoze, 100 mg/l borne kiseline i 300 mg/l kalcijum nitrata (Sharafi, 2011.). Podjednak postotak klijavosti kao i razvoj peludove cijevi odvija se pri koncentracijama od 2.5 % do 20 % saharoze (May, 2004.). Dodatak gore navedenih mikroelemenata u medij za klijanje uvjetuju bolju klijavost peludi.

Nekoliko fizioloških faktora može utjecati na smanjenje klijavosti peludi npr. višak dušika (Okamoto i sur. 1991), višak inhibitora klijavosti peludi izlučenih iz tučka (Okamoto i sur. 1995.), visoka koncentracija giberelina (Kimura i sur., 1996)., deficit bora (Malavolta i sur., 1997) i utjecaj okolišnih uvjeta (Wang i sur., 1996).

Biljni hormoni također imaju utjecaj na klijavost peludi. Ukoliko je u *in vitro* uvjetima dodana giberelinska kiselina u koncentraciji većoj od 5 mg/kg dolazi do slabijeg klijanja peludi (Weaver i McCune, 1960; preuzeto iz May, 2004). Međutim, iako je u kulturi tkiva dodatak giberelinske kiseline nepovovljno utjecao na klijavost, u ukupnoj fiziološkoj aktivnosti biljke tijekom procesa oplodnje pokazalo se da je ovaj hormon neophodan kako bi došlo do klijanja peludove cijevi kroz provodno tkivo tučka (Swain i Muller, 2003).

Ukoliko se u medij sa peludnim zrncima doda njuškica tučka poboljšava se klijavost i rast peludove cijevi (May, 2004).

Unutar istoga genotipa postoje razlike u klijavosti peludi. Staudt i Kassrawi (1972) su utvrdili da neki klonovi sorte Rajnski rizling posjeduju slabije klijavu pelud.

Vrijeme uzorkovanja peludi također utječe na postotak klijavosti (May, 2004). Tako prema May (2004) klijavost peludi sakupljene netom prije otvaranja cvijeta iznosi 30%, zatim 65 % u trenutku nakon opadanja kapice te 49% nakon toga sve dok je njuškica tučka još svježa. Nakon što njuškica tučka postane smeđa a peludovnice tamno žute klijavost pada na 21 % (Mayer, 1964; Bronner i Wagner, 1997). Prema Miroševiću (1981), tijekom 6 sati proklije između 75 % i 90 % peludovih zrnaca od ukupnog broja proklijalih peludovih zrnaca a najveća energija klijanja je u vremenu od 6 sati nakon naklijavanja.

Pri sobnoj temperaturi 22 ^{0}C pelud zadržava jednaku razinu vijabilnosti otprilike 3 dana (Staudt, 1985). Optimalna temperatura za klijanje peludi ovisi o kultivaru ali generalni povoljni rangovi temperature kreću se od 25 do 30 ^{0}C (Sharafi, 2011).

U praksi je kod problematičnih sorata uz inducirano oprašivanje potrebno i prstenovanje ili tretman sa 4-MCP (4-metil-klor-propan) nakon cvatnje kako bi došlo do proizvodno zadovoljavajućeg zametanja i razvoja peludi (May, 2004).

3.5.3 Morfološke i biološke karakteristike nefunkcionalne peludi

Kod sorata sa ženskim cvijetom i nekih sa slabijom oplodnjom utvrđene su abnormalnosti u procesu mikrosporogeneze. Da Silva (2001) je utvrdio promjene na citogenetičkoj razini kod sorte Rubi koja u pravilu posjeduje normalno razvijene bobice sa sjemenkom. Problemi pojave besjemenosti su utvrđeni na pojedinim trsovima kod kojih dolazi do formiranja cvatova koji se kasnije razvijaju u grozdove sa besjemenim bobicama. Kod ovih očitih besjemenih klonova sorte Rubi problem besjemenosti je istraživan na bazi promjene u mejotičkoj diobi tijekom mikrosporogeneze. Najučestalija abnormalnost bila je povezana sa segregacijom kromosoma. Uočena je preuranjena migracija kromosoma prema polovima u metafazi 1 i 2, što je rezultiralo pojavom mikronukleusa i mikrocita u tetradama, te poremećena orijentacija ekvatorijalne ravnine bivalenata. Istraživanjem su bile uočene i neke manje izražene abnormalnosti npr. mikrosporocite povezane citoplazmatskim kanalima, anafazni mostovi, tripolarna diobena vretena tijekom druge mejoze što dovodi do trijadne forme u kojoj je jedna mikrospora nereducirana. Pojava ovakvih fenotipova povezana je s većom sterilnosti peluda. Pelud sa cvatova gdje dolazi do lošije oplodnje imala je klijavost 78% a pelud sa cvatova koje razvijaju normalne grozdove 90% (Da Silva, 2001).

3.6 Kvaliteta grožđa i vina od besjemenih sorata

Utjecaj bobica određene veličine na kvalitetu grožđa istraživao je Muller-Thurgau (1883), (preuzeto iz May, 2004). Težina razvijenih bobica karakteristične veličine za sortu (eng.- „hens“) kod sorte Rajnski rizling bila je prosječno 0.9 g a sadržavale su 12,3 % šećera i 15,7 % kiselina, dok su male nerazvijene bobice (eng.- „chickens“) imale prosječnu masu 0,23 g i sadržavale 14,7 % šećera i 11 % kiselina. Do sličnih su rezultata došli i Rabion i sur. (1986): pri čemu je sa smanjenjem promjera u uzorku bobica u rasponu promjera 13 do 5 mm koncentracija kalija i jabučne kiseline opala dok je koncentracija magnezija, vinske kiseline, reducirajućih šećera i antocijana porasla. Uzorak bobica većih od 7 mm i težine 300 grama dao je 170-180 ml soka dok je uzorak bobica manjih od 7 mm dao 120- 160 ml soka. Cahurel (1999), je kod grozdova sorte Gamay u

regiji Beaujolais utvrdio da sadrže maseni udio od 34 % malih neoplođenih bobica u grozdu (352 g naspram 693 g velikih oplođenih bobica). Isti autor također je utvrdio da postoje razlike i u kemijskom sastavu u odnosu velike bobice: male bobice. Taj odnos je sljedeći: sadržaj šećera 10:11.8 stupnjeva po Baume-u ili 18-21.3 ^{0}Brix, sadržaj kiselina 6.6:6 g/L H_2SO_4 i u koncentraciji antocijana 0,63:1,07 g/kg.

Barbagallo je (2010) utvrdio promjenu pojedinih parametara s obzirom na razinu kategorije bobice (najmanje bobice svrstane su u rang manje ili jednako 1.5 g., zatim 1,51-2, 2,01-2,5 i najveće 2,51 i više). Negativana korelacija bila je utvrđen u koncentraciji šećera sa porastom veličine bobice. Korelacija nije bila utvrđena između veličine bobice i ukupne kiselosti u moštu.

Utjecaj na prinos i kemijski sastav grožđa i mošta kod sorte Grk istraživali su Preiner i sur., (2012). U istraživanju su uzimane u obzir razlike između klonskih kadidata u dvije godine istraživanja. Klonski kandidat „Grk-20“ je pokazao najmanji a „Grk-09“ najveći udio besjemenih bobica tijekom obje godine istraživanja. Prosječna masa besjemenih bobica kretala se između 0,5 i 1 g, dok je prosječna masa bobica sa sjemenkom iznosila između 3,2 i 3,8 grama. Sadržaj šećera u moštu bio je u 2010. godini signifikantno veći u besjemenim bobicama dok ta razlika u 2009. godini nije bila signifikantna. Ukupna kiselost bila je signifikantno veća kod besjemenih bobica u 2009. godini ali i signifikantno manja u 2010. godini u odnosu na bobice sa sjemenkom. Jedno od objašnjenja za ovo moglo bi biti što je prinos u 2010. godini bio signifikantno veći nego 2009. godini što u konačnici ima različiti utjecaj na sadržaj šećera i ukupne kiselosti. U prilog tome govori teza da veći prinos rezultira manjim sadržajem šećera i kiselina (Jackson i Lombard, 1993). Prosjek šećera u dvogodišnjem razdoblju je bio nešto veći kod besjemenih bobica dok je sadržaj kiselina ostao nepromjenjen (Preiner i sur., 2012).

Najveća i signifikantno pozitivna korelacija utvrđena je između parametara udjela besjemenih bobica u masi grozda i prosječne težine sjemenih bobica, sadržaja vinske kiselina i slobodnih hlapivih terpena. Ukoliko je veći udio besjemenih bobica, biti će i veća prosječna masa oplođenih bobica, veći sadržaj vinske kiseline i slobodnih hlapivih fenola. Jedina negativna korelacija bila je uočena između sadržaja neoplođenih besjemenih bobica i sadržaja jabučne kiseline. Veći sadržaj besjemenih bobica nije imao signifikantan utjecaj na prinos i sadržaj šećera (Preiner i sur., 2012).

Kod nekih sorata postoji i tendencija pojave nezrelih i zelenih bobica. Takve bobice ne doprinose kvaliteti, a ako su prisutne u većem broju mogu negativno utjecati na kvalitetu grožđa zbog visokog sadržaja organskih kiselina i nezrelih tanina.

3.6.1 Fenoli u grožđu i vinu

Fenoli u vinu su važni faktori kvalitete vina koji utječu na boju, okus, i opći dojam kod vina. Najveći dio polifenola u vinu je porijeklom iz grožđa iako se dio polifenolnih spojeva tijekom vinifikacije može ekstrahirati iz stjenki bačava ili pak sintetizirati djelovanjem nepoželjne mikroflore u vinu. Kod crnih vina polifenolni spojevi su odgovorni za boju vina i za specifičan okus (gorčina i astringentnost). Polifenoli u vino prelaze iz kožice i sjemenke tehnološkim procesom maceracije. Kako je u proizvodnji bijelih vina cilj čim prije odvajanje tekuće faze od čvrstih dijelova grozda (kožica, sjemenka, peteljka) tako ne dolazi niti do jake ekstrakcije polifenola u mošt. (Jackson, 2008).

Sadržaj ukupnih fenola kod sorata Chardonnay, Sauvignon Blanc i Villard Blanc sa područja južne Francuske bili su redom, 4126 mg/kg svježeg uzorka, 2446 mg/kg s.u.[1] te 2280 mg/kg s.u. Ove vrijednosti značajno su manje nego kod crnih sorata Pinot Noir, Syrah, Grenache (7722 mg/kg s.u., 6071 mg/kg s.u. te 3658 mg/kg s.u.) (Bourzeix i sur., 1983; preuzeto iz Jackson, 2008).

Manja količina polifenolnih spojeva u bijelom vinu je poželjna jer vinu daje boju, doprinosi kompleksnijem okusu, ali može imati i negativnu ulogu koja se očituje u jačoj sklonosti oksidativnom posmeđenju (Lea, 1979).

Ime sorte Grk asocira na lokalnu riječ „gark“ odnosno „gorak“ a upravo se takva karakteristika ovoga vina navodi kao njegova sortna specifičnost u okusu (Mirošević i sur., 2012).

Najzastupljenija grupa polifenola u bijelom vinu su neflavonoidni spojevi od kojih najviše ima hidroksicimetnih kiselina i u manjoj mjeri monomeri flavan-3-ola (Kennedy, 2008). Hidroksicimetne kiseline kao i antocijani imaju utjecaj na vizualnu komponentu vina dok monomeri flavan-3-ola utječu na osjet gorčine (Kennedy, 2008).

U hidroksicimetne kiseline spadaju: p-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska a u monomere flavan- 3- ola (+)- katehin, (-)- epikatehin, (-)- epigalaktokatehin, (-)- epikatehin-3-*0*- galat (Su i Singelton, 1969).

Hidroksicimetne kiseline spadaju u skupinu neflavonoida i za razliku od ostalih grupa one su u najvećoj mjeri zastupljene u vinu. Osim navedenih u vinu su zastupljene i hidroksibenzojeve kiseline. Pojedini spojevi iz obje grupe i njihovi derivati se najvećim djelom nalaze u mesu bijelog grožđa u koncentracijama do 200 mg/l mjereno u moštu (Onag i Nagel, 1978) (preuzeto iz Smith i Waters, 2012). Kožica kod bijelih sortata također

[1] miligrama po kilogramu svježeg uzorka

sadrži do 45 mg/kg hidroksicinamata (Rodriguez Montealegre i sur., 2006). Ovi spojevi najčešće se u grožđu nalaze u vidu estera vezanih sa vinskom kiselinom (Riberau-Gayon, 1965) a u grožđu se sintetiziraju prije šare (Romeyer i sur., 1983). Ukupna koncentracija i odnos pojedinih spojeva iz skupine hidroksicimetnih kiselina u grožđu ovisi o brojnim faktorima kao što su sorta, klima, tehnologija uzgoja, itd. Iz toga razloga analizom mošta i vina se mogu utvrditi različite koncentracije ovih spojeva u različitim moštevima i vinima. Također kako se većina hidroksicimetnih kiselina nalazi u obliku estera sa vinskom kiselinom koncentracija ovih spojeva u starijim vinima može biti viša nego kod mladih vina i mošta što je posljedica hidrolize estera. (Moreno- Arribas i sur, 2009).

Na uzorku od 26 vina iz područja Grčke bilo je utvrđeno da je koncentracija hidroksicimetnih kiselina šest puta veća nego koncentracija ostalih polifenolnih spojeva zajedno (Makris i sur., 2003).

Od pojedinih spojeva iz grupe hidroksicimetnih kiselina najzastupljenija je kaftarinska kiselina sa gotovo 50 % od ukupnog broja utvrđenih spojeva iz ove grupe (Kumušta, 2012). Udio kaftarinske kod sorte Rizling rajnski u vinima iz Češke iznosio je od 5.11 mg/l do 21.46 mg/l (Kumušta, 2012). Ukupna koncentracija kafeinske i kumarinske kiseline u vinu sorte Muškat bila je od šest do šesnaest puta viša nego ukupna koncentracija ostalih fenolnih spojeva iz grupe flavan-3-ola, katehina i epikatehina (Karagiannis i sur., 2000). Betes- Saura i sur. (1996) utvrdili su u moštu bijelih sorata iz regije Penedes 46.76 mg/l hidroksicimetnih kiselina dok je ona kasnije u vinu iznosila 34,07 mg/l. Hidroksicimetne kiseline u tome istraživanju činile su 73% ukupnih polifenola. Najveću koncentraciju imala je kaftarinska kiselina sa vrijednostima između 10 i 13 mg/l. Okamura i Watanabe (1981) dali su prosječne vrijednosti za koncentracije pojedinih spojeva hidroksicimetnih kiselina u bijelim vinima (Tablica 1) (preuzeto iz Moreno- Arribas i sur, 2009.).

Tablica 1. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u vinima različitih sorata u različitim klimatskim područjima (Okamura i Watanabe, 1981., preuzeto iz Moreno- Arribas i sur, 2009).

	Semillon (FRA)	**Chardonnay (Ca, SAD)**	**Rajnski Rizling (NJEM.)**
Kaftarinska (mg/l)	23	29	51
Kutarinska (mg/l)	5	10	13
Kafeinska (mg/l)	0,9	1,7	4,1
Kumarinska (mg/l)	0,7	0,9	2,9

Najpoznatiji spojevi iz grupe hidroksibenzojevih kiselina u vinu su protokatehuinska kiselina i p-hidroksibenzojeva kiselina koja je pronađena i u slobodnoj formi (Pozo-Bayon i sur., 2003). U većim koncentracijama u vinu se često nalazi galna kiselina (Rentzsch i sur., 2009). Istraživanjem Kumušta i sur., (2012) kod sorte Rizling rajnski na području Češke utvrđena je najveća koncentracija protokatehuinske kiseline (srednja vrijednost 2,54 mg/l) a nakon nje i galne (2,39 mg/l). Pozo-Bayon i sur. (2003) su utvrdili vrijednosti između 0,3 i 1,3 mg/l galne kiseline u pjenušavim vinima dobivenih vinifikacijom bijelih i crnih sorata sa područja Španjolske. Isti autori su utvrdili i koncentracije prokatehuinske kiseline koje su se kretala između 0,5 i 0,93 mg/l.

Većina hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina smatraju se astringentnima i gorkima (Singelton i Noble, 1976; Makris, 2006). Boselli i sur. (2006) su utvrdili da su kod sorata Verdiccio i Passerina koncentracije galne i kafeinske kiseline korelirane sa opaženom gorčinom u vinu (preuzeto iz Smith i Waters., 2012). Međutim takva korelacija može biti povezana sa korelacijom i ostalih polifenolnih spojeva (Smith i Waters., 2012).

Iz skupine flavan-3-ola dominantni spojevi su katehin, epikatehin, epigalaktokatehin i ester epikatehin galat (Smith i Waters., 2012).

Najveći dio ovih spojeva potječe primarno iz sjemenke, a djelomično i iz kožice bobice (Singelton i sur., 1966; Czochanka i sur, 1979; Romeyer i sur. 1986). Najintenzivnija sinteza flavan-3-ola odvija se u vrijeme šare, a koncentracija im se mijenja tijekom dozrijevanja (Kennedy, 2005). U bijelim vinima ukupna količina flavonoida čini manje od 20% ukupnog sadržaja fenola (do 50 mg/l) (Jackson, 2008). Kumušta i sur. (2012) u vinima iz Češke utvrdili su koncentraciju katehina od 2.77 mg/l te epikatehina 0,94 mg/l a slične vrijednosti utvrđene su i u vinima Rajnskog rizlinga sa područja Njemačke (2,5 mg/l katehina i 0,9 mg/l epikatehina). Na uzorku od 57 francuskih bijelih vina prosječna koncentracija katehina bila je 10 mg/l, a epikatehina 5 mg/l (Carando i sur., 1999) (preuzeto iz Smith i Waters., 2012). Kod jedanaest vina iz Grčke koncentracija katehina bila je između 12 i 40 mg/l (Proestos i sur., 2005). Ukupna koncentracija katehina i epikatehina u bijelim vinima iz Portugala kretala se oko 30 mg/l (De limai i sur, 2006); preuzeto iz Smith i Waters., 2012). Lea i sur. (1979) su kod sorte Seyval blanc utvrdili količinu od 5,8 mg/l flavan-3-ola. Koncentracija flavan-3-ola u moštu i vinu značajno se povećava tijekom procesa maceracije gdje se ovi spojevi izlučuju iz sjemenke koje su sastavni dio masulja.

Katalinić i sur. (2010) utvrdili su u kožicama sedam bijelih sorata (Kujundžuša, Rkaciteli, Zlatarica, Medna, Kuč, Maraština, Debit) iz područja Dalmacije koncentracije

monomera flavan-3-ola: katehina, epikatehina i epikatehin galata. Pritome su se koncentracije katehina kretale od 1,25 mg/kg s.u. (Kuč, Rkaciteli) i 4,04 mg/kg s.u. (Zlatarica), epikatehina između 0,76 mg/kg s.u. (Kuč) i 2,22 mg/kg s.u. (Debit) te epikatehin galata 0,24 mg/kg s.u. (Kuč) i 2,64 mg/kg s.u. (Rkaciteli).

Flavan-3-oli daju okus gorčine ali i astringentnosti (Singelton i sur., 1966; Czochanka i sur, 1979; Romeyer i sur. 1986) (preuzeto iz Kennedy, 2005). Glavni spoj iz skupine flavonola, katehin, opisan je kao nositelj svojstava astringentnosti i gorčine (Robichaud i Noble, 1990). Osjet gorčine ostalih spojeva iz ove skupine epikatehina, epikatehin galata i galaktoepikatehina povezan je također s osjetom gorčine kod bijelih vina (Smith i Waters., 2012). Utjecaj ovih spojeva osobito je izražen ukoliko se u proizvodnji vina primjenjuje proces maceracije (Smith i Waters, 2012). Molekule manje molekulske mase iz ove skupine spojeva posjeduju gorčinu dok one veće molekulske mase posjeduju astrigenciju. Shodno tome su flavan-3-oli porijeklom iz sjemenke odgovorni za gorčinu dok su oni iz kožice odgovorni za astrigenciju (Kennedy, 2005).

Osim monomernih oblika flavan-3-ola u moštu i vinu se mogu naći i njihovi polimeri. Dimeri i trimeri katehina i epikatehina nazivaju se procijanidini. Najzastupljeniji spojevi ovoga tipa su B procijanidini koji u osnovi predstavljaju dimere (+)- katehina i (-)-epikatehina. Ovi spojevi prvotno su identificirani u sjemenci, ali su također prisutni i u kožici i stabljici (Ricardo da Silva i sur., 1991) (preuzeto iz Moreno- Arribas, 2009). Tragovi procijanidina B1 do B4 bili su detektirani i u mesu bobice (Bourzeix i sur., 1986). Najveći dio procijanidina u vinu je porijeklom iz grožđa dok manji dio može biti porijeklom iz stijenke bačve. Najpoznatiji procijanidini su: procijanidin B1, procijanidin B2, procijanidin B3 i procijanidin B4 a utvrđeni su i u bijelim vinima. Razlike između navedenih oblika procijanidina uvjetovane su mjestom formiranjem kemijskih veza između inicijalne i terminalne molekule katehina i epikatehina (Jackson, 2008).

Lea i sur. (1979) su u bijelom vinu sorti Rizvanac i Seyval blanc utvrdili procijanidine te njihove koncentracije. Kod sorte Seyval utvrđena je koncentracija od 6.6 mg/l procijanidina (diamerni, trimerni i polimerni obllici). Katalinić i sur. (2010) utvrdili su koncentracije procijanidina B1 kod sedam ranije navedenih sorata u koncentracijama od 1,70 mg/kg s.u. (Kuč) do 10,65 mg/kg s.u. (Zlatarica) te procijanidina B2 od 0,44 mg/kg s.u. (Kuč) do 7,13 mg/kg s.u. (Medna).

U grožđu i vinima bijelih sorata utvrđeni su spojevi i iz grupe flavonola a nalaze se većinom u glikoliziranim oblicima. U najvećim koncentracijama nalazi se kvercitin-3-*O*-glukozid dok se glikozidi miricetina, kaempferola i isorhamnetina prisutni u vrlo malim koncentracijama (Vilanova i sur., 2009). Prema Makris i sur. (2006) koncentracija

flavovnola u bijelim vinima kreće se od 1-3 mg/l ali detektirana je i koncentracija od 10 mg/l. Pojedini autori (Alonso i sur, 1986; Betes- Saura i sur., 1996) (preuzeto iz Moreno-Arribas i sur, 2009) utvrdili su u moštu bijelih sorata vrlo niske količine kvercitin-3-*O*-glukozida te tragove kaemferol-3-*O*-glukozida. Koncentracija kaempferol-3-*O*-glukozida bila je prosječno 0.5 mg/l u moštu dok je u vinu iznosila 0,4 mg/l. Koncentracija flavonola u kožici bobice raste s pojačanim izlaganjem suncu, što sugerira da oni imaju ulogu zaštite tkiva bobice od štetnog utjecaja sunčevih zraka (Smith i Waters, 2012). Koncentracija kvercitin-3-*O*-glukozida u kožici grožđa može se kretati i do 70 mg/kg kod sorte Viogener (Montealegre i sur., 2006) te do 28 mg/kg u moštu nekoliko španjolskih kultivara (Vilanova i sur., 2009). Katalinić i sur. (2010) utvrdili su u kožici grožđa sedam bijelih sorata (Kujundžuša, Rkaciteli, Zlatarica, Medna, Kuč, Maraština, Debit) iz područja Dalmacije koncentracije kvercitin-4-*O*- glukozida u vrijednostima između 0,21 mg/kg s.u (Maraština) i 2,55 mg/kg s.u. (Kujundžuša). Prema Dedic i Belleau (1973), u vodenoj otopini kvercitin daje dominantno gorak osjet sa vrlo slabim naznakama astringentnosti (Smith i Waters, 2012).

Andabaka (2015) je istraživao polifenolni sastav četrdesetak sorata, a kod Grka i Žilavke utvrdio je najveću koncentraciju epikatehina, galokatehina, procijanidina B2 od svih istraživanih bijelih sorata.

Ramchamadni (2010) je istraživao udio galne kiseline, katehina i procijanidina B3 kod sjemenih sorti Bangalore blue (crna) i Pandhari Sahebi (bijela) te nekih besjemenih sorata, Thompson Seedless (bijela) i Sharad seedless (crna). Sadržaj galne kiseline bio najveći kod Sharad seedless (4,6 mg/g), zatim kod Pandhari Sahebi (1,53 mg/g), Bangalore blue (1,17 mg/g) a najmanja kod Thompson seedless (0,7 mg/g). Sadržaj katehina bio je najveći kod Sharad seedless (28,3 mg/g), zatim Padhari Sahebi (2 mg/g) te Thompson seedless (1,49 mg/g) i Bangalore blue (1,36 mg/g). Sadržaj procijanidina B3 bio je također najveći kod sorte Sharad seedles (39,6 mg/g), zatim Pandhari Sahebi (2,69 mg/g, Thompson seedless (2 mg/g), i Bangalore blue (1,44 mg/g).

Stilbeni su polifenoli koji su prisutni u raznim biljnim vrstama, ali u grožđu i vinu su daleko najpristupačniji (Guebailia i sur., 2006). Oni su derivati cimetne kiseline koji se sintetiziraju u biljci kao posljedica izloženosti stresu (infekcija mikroorganizmima ili prejaka izloženost UV zračenju), a tijekom vinifikacije prelaze u mošt i vino (Guebailia i sur., 2006). Imaju izraženo antioksidativno, antimutageno i antikancerogeno djelovanje (Buiarelli i sur., 2007), pa blagotvorno djeluju na ljudsko zdravlje.

Jedan od najpoznatijih i najistraživijih spojeva iz grupe stilbena jest *trans*-resveratrol (3,5,4-trihidroksistilben), fitoaleksin koji nastaje kao odgovor biljke na gljivičnu

zarazu, posebice *Botrytis cinerea-u* (Rentzsch i sur., 2009). Sinteza resveratrola se odvija uglavnom u kožici bobice, te resveratrol nalazimo samo u tragovima u mesu bobice (Rentzsch i sur., 2009).

Stilbene možemo pronaći i u oligomernim i polimernim formama, tzv. viniferinima. Oni nastaju oksidativnom polimerizacijom resveratrola, uz katalitičko djelovanje peroksidaze (Jean-Denis i sur., 2006).

Sadržaj stilbena u vinu ovisi o klimatskim uvjetima, sorti grožđa, gljivičnim oboljenjima, UV zračenju, te enološkim metodama (Perrone i sur., 2007; Püssa i sur., 2006; Cantos i sur., 2003). Crna vina općenito sadrže više stilbena nego bijela, zbog maceracije, odnosno duljeg kontakta kožice i tekućeg dijela masulja tijekom vinifikacije (Perrone i sur., 2007). Ribéreau-Gayon i sur. (2000) navode vrijednosti stilbena od 1-3 mg/l.

4 MATERIJALI I METODE

4.1 Materijali

Predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je sorta Grk, odnosno biljni materijal koji uključuje cvjetove, netom zametnute plodove i plodove u punoj zrelosti (grožđe). Kako kod sorte Grk dolazi do pojave dva tipa bobica, manjih besjemenih i većih bobica koje sadrže sjemenku u daljnjem tekstu disertacije će se radi lakšega snalaženja za male besjemene bobice koristiti naziv lokalnog karaktera „pasoline“, a za veće bobice sa sjemenkom naziv sjemene bobice. U istraživanje su također uključene i sorte Chardonnay, Plavac mali i Pošip bijeli.

4.1.1 Sorte u istraživanju

Grk

SINONIMI: Gark, Korčulanac, Korčulanski grk, Lumbarajski gark, Grk lumbarajski, Grk veli, Grk mali

PORIJEKLO SORTE I POVIJEST UZGOJA: Grk se smatra autohtonom sortom otoka Korčule. Ime ove sorte prema nekim teorijama sugerira da potječe iz Grčke. Međutim, do danas ova teorija odnosno srodnost sa grčkim sortama nije potvrđena (Šimon i sur., 2006). Zbog srodnosti sa sortom Crljenak kaštelanski (roditelj-potomak), kao i zbog srodnosti sa ostalim autohtonim dalmatinskim sortama, vjerojatnije je da potječe s ovih prostora (Pejić i sur., 2000; Maletić i sur., 2004). Jedna od teorija navodi da je ime dobio prema svojstvima vina (lokalni naziv „gark“ znači gorak). Ritter von Heintl (1821) navodi Grk kao sortu koja se uzgaja na dubrovačkom području, a Petter (1857) ga povezuje sa Korčulom. Anonimus 1 (1857) navodi da se Grk uzgaja i na Lokrumu. Dudan (1898) ubraja vino Grk u desertna i medicinalna vina. Anonimus 2 (1890) spominje ga u kontekstu vina koja su bila izložena na izložbi u Beču citatom „*ali ima i priličan broj sladkokusnih staklenica, medju kojimi se iztiče omiški ružić-muškat, bračka vugava, šibenska maraština, hvarski prošek, korčulanski grk i dubrovačka malvasija*“. Anonimus 3 (1857) izvještava o ocjenjivanju vina iz jugoslavenskih pokrajna u Beču citatom „*Pečeno po gospodarskom društvu iz Orebića poslano, istom tako i Malvasija po gospodars. društvu Dubrovačkom izloženo zadobi podpuno priznanje. Do ovih dviuh vrstih staše ponajbliže vino pod imenom Grk*“.

RASPROSTRANJENOST: Lokalnog je značenja pa je osim na Korčuli rasprostranjen vrlo slabo na Mljetu, Šipanu, Pelješcu i dubrovačkom priobalju. U 2013. godini na području Republike Hrvatske nalazi se 16,15 ha vinograda zasađenih Grkom (Vinogradarski registar, APPRR).

Botanička obilježja: vršci mladica su uspravni, neznatno povinuti, svjetlozeleni i vunasto bjeličasti. Mladi list je žute boje.

Mladica je uspravno rastuća, jaka, s kratkim člancima, zelena s nježnim ljubičastim nahukom na sunčanoj strani.

Cvijet je morfološki dvospolan, a funkcionalno ženski.

Odrasli list je trodjelan ili peterodjelan s pravilnim sinusima, a sinus peteljke ima oblik „U“. List je pentagonalan, sa uvrnutim rubovima prema naličju. Srednje je veličine, lice lista je golo svjetlozelene boje a naličje pustenasto s rijetkim čekinjastim dlakama na nervaturi. Zupci na rubovima lista su tupi i uvrnuti prema doje.

Zreo grozd je srednje velik do velik (Slika 4). Masa grozda varira ovisno o postotku zastupljenosti velikih sjemenih bobica odnosno malih besjemenih bobica. Piramidalnoga je oblika, dug, zbijen, može sadržavati jedno a rijetko dva krilca. Zrele bobice su okrugle. Velike boboce sadrže 1-3 sjemenke i 3-4 puta su veće od malih besjemenih bobica. Kožica je debela i tvrda, a u tehnološkoj zrelosti zlatnožute do jantarne boje i prozirna. Površina kožica posuta je tamnim, gustim, sitnim točkicama, a pupčana točka je izražena. Meso je sočno i slatko.

Rozgva je debela, kratkih žućkastih do svjetlokestenjastih, na sunčanoj strani tamnih članaka i zadebljalih koljenaca s crvenkasto sivkastom nijanskom. Pup je izražen.

Rast je snažan, bujan, uspravnog trsa i rozgve.

FENOLOŠKI PODACI: Odgovaraju mu lakša, propusna i pjeskovita tla i toplija klima. Sa vegetacijom kreće rano do srednje kasno. Oplodnja neredovita, zbog funkcionalno ženskog cvijeta. Kao najbolji oprašivači smatraju se Plavac mali i Maraština. Dozrijeva krajem drugoga i početkom trećega razdoblja.

TEHNOLOGIJA UZGOJA: Sorti odgovara povišeni sustav uzgoja sa kratkim rezom rodnog drva. Rodnost varira ovisno o stupnju oplodnje a prinosi variraju od 4- 8 t/ha. Sadržaj sladora kreće se od 18- 27% a sadržaj ukupne kiselosti od 5-8 g/l.

KVALITETA VINA: Vino je cijenjeno a posebice ono sa škrtih položaja. Tako je osobito cijenjeno vino sa pjeskovitih položaja iz Lumbardskog polja na Korčuli. Vino ima izražen sortni miris te okus koji podsjeća na vino „marsala“ (Mirošević, 2003). Dužim dozrijevanjem vino dobiva okus na „xeres“ vina (Mirošević, 2003).



Slika 4. Sorta Grk (Vitis vinifera L.) u vrijeme fenofaze šare.

Plavac mali crni

SINONIMI: Pagadebit crni, Crljenak, Kaštelanac, Praskavac, Zelenjak, Viška, Čvrstac, Crvenak, Greštavac, Šarac

PODRIJETLO I RASPROSTRANJENOST Smatra se da je autohtona sorta Dalmacije. Nastao je spontanim križanjem Crljenka kaštelanskog (Tribidraga) i Dobričića (Maletić i sur., 2004). Plavac mali najviše se uzgaja u podregiji Srednja i Južna Dalmacija, ali nalazimo ga i na otoku Krku, te u podregijama Sjeverna Dalmacija i Dalmatinska zagora. Najviše ga ima na poluotoku Pelješcu, na otocima Korčuli, Hvaru, Visu i Braču, te u podbiokovskom priobalju i Kaštelima. Danas na području Republike Hrvatske nalazimo 1715,84 ha (Vinogradarski registar, APPRR) vinograda zasađenih Plavcem malim, čime se ova sorta nalazi na trećem mjestu prema zastupljenosti u sortimentu Republike Hrvatske.

POVIJEST UZGOJA: Prvi spomen ove sorte koji je do danas pronađen datira iz 1821. godine u dijelu Franza Riterra von Heintl-a pod nazivom Plavaz mali czerni. Sortu je prvi puta opisao Trummer (1841)., a nakon njega i Goethe (1887). Dochnahl (1858) sistematizira i opisuje voćne vrste te navodi Blauer Plavanz, odnosno Plavanz mali zerni. Vino Plavca malog bilo je prvo vino u bivšoj Jugoslaviji sa zaštićenim geografskim podrijetlom (Dingač, berba 1961. god.).

BOTANIČKA OBILJEŽJA: Vršci mladica su malo povinuti, rastvoreni, paučinasto dlakavi, sivo-zelene boje s rubnim crvenilom na mladim listićima. Naličje mladih listića je paučinasto dlakavo.

Mladica je okrugla, zelena a na sunčanoj strani s crvenkasto-smećkastim nahukom, slabo paučinasta.

Cvijet je morfološki i funkcionalno dvospolan.

Odrasli list je pentagonalan do srcolik, srednje veličine, uglavnom peterodjelan sa sinusom peteljke u obliku slova „U“ ili u obliku lire, često preklopljene. Gornji postrani sinusi su srednje urezani, ponekad preklopljeni, dok su donji sinusi plići i otvoreni. Plojka je kožasta, mjehurasto naborana, tamnozelenog lica, svjetlijeg naličja s izraženim glavnim žilama. Lice odraslog lista je golo, dok je naličje vunasto dlakavo. Peteljka srednje dugačka, tamnije zelena s izrazitim crvenkasto- ljubičastim preljevom.

Zreo grozd je srednje veličine, ljevkastog oblika, najčešće s jednim krilcem, srednje zbijen, kratke crvenkaste , do koljenca odrvenjele peteljke. Zrele bobice su srednje velike, okrugle, tamnoplave s izrazitim maškom, debele kožice, čvrste konzistencije mesa, sočne.

Rozgva je jaka, okrugla do eliptična, smeđeljubičastih članaka i tamnije nijansiranih koljenaca sa sivosrebrnkastim preljevom po cijeloj površini.

Rast srednje bujan.

FENOLOŠKI PODACI: Prikladna su propusna tla južnih ekspozicija te mediteranska klima. Kreće kasno sa vegetacijom, a dozrijeva kasno u IV. razdoblju prema Pulliatu.

Oplodnja je redovita a dozrijevanje je nejednoliko, stoga se na jednom grozdu mogu naći i prosušene i nezrele bobice.

PRAKTIČNA ISKUSTVA: Najbolje proizvodne rezultate postiže uzgojem na klasičnom niskom račvastom sustavu uzgoju. Podnosi isključivo kratki rez. Rodnost je redovita i na dobrim položajima daje izrazito visoku kakvoću grožđa. Prinosi se kreću od 40 do 60

dt/ha na najboljim položajima. U krškim poljima i na plodnim poljima prinos može doseći i 150 dt/ha ali i kakvoća je znatno lošija.

Tolerantnost na bolesti je dobra, osim nešto slabije na pepelnicu.

Pošip

SINONIMI: Pošipak, Pošipica

PORIJEKLO SORTE I POVIJEST UZGOJA: Prvi put sorta se spominje 1821. (Heintl), tj spominju se dvije sorte *„Possip mala bila“ i „Possip velika“*, koje se uzgajaju na području Dalmacije. Anonimus 4 (1887) navodi vina koja se proizvode na trogirskom području kao “žukasti pošip i vugava“ Petter (1857) spominje sortu pošip isključivo za područje Trogira, dok je vezano za Korčulu uopće ne spominje. Pošip je prvo hrvatsko bijelo vino sa zaštićenim geografskim podrijetlom (1967. godine). Bulić (1949) napominje da se Pošip prije filoksere uzgajao samo na Korčuli, te sporadično na Mljetu.

PODRIJETLO I RASPROSTRANJENOST: Sorta je podrijetlom sa otoka Korčule, nastala kao spontani križanac Bratkovine bijele i Zlatarice blatske bijele (Piljac i sur., 2002).

Rasprostranjen je u manjoj mjeri na otocima Mljetu, Lastovu, Hvaru, Braču, poluotoku Pelješcu, te na nekoliko položaja u sjevernoj Dalmaciji. Danas na području Republike Hrvatske nalazimo 290,1 ha vinograda zasađenih Pošipom (Vinogradarski registar, APPRR).

BOTANIČKA OBILJEŽJA: Vršci mladica su udičasti, svijetlozelene ili žućkast-svijetlozelene boje, broncirani, goli.

Mladica je snažna, okrugla do malo eliptična i slabo rebrasta. Svijetlozelene je boje a na osunčanoj strani jače nijansirana.

Cvijet je dvospolan.

Odrasli list je velik, srcolik, trodjelan ili peterodjelan sa srednjedubokim, otvorenim gornjim lateralnim sinusima oblika „U“ ili „V“ dok su donji sinusi plitki, otvoreni. Peteljkin sinus je pravokutan ili u obliku slova „U“ ili lire. Lice lista je glatko, golo, svjetlozeleno a naličje blijedozeleno, golo. Zupci su veliki, šiljasti.

Zreli grozd je srednje velik do velik, koničnog ili ljevkastog oblika, krilat, razgranat i rastresit sa dva do tri krilca na dugoj obješenoj peteljkovini.

Zrele bobice su izraženo jajolike, pri vrhu ušiljene. Boje su zelenožute do zlatnožute ili jantarne, ovisno o bujnosti trsa, položaju grozda na trsu i vremenu berbe. Kožica je tanka, poluprozirna. Meso je hrustavo, sočno i slatko.

Rozgva je žutosmeđa, s crvenkasto-ljubičastim pepeljastim preljevom na osunčanoj strani, poglavito na koljencima, posuta tamnim točkicama. Na presjeku eliptična, srednje debljine i uske srži

Rast je srednje bujan do bujan.

FENOLOŠKI PODACI: Nema posebnih zahtjeva prema tlu iako voli propusna, topla tla juga i mediteranske klime. Oplodnja je dobra a dozrijeva u II. epohi prema Pulliatu.

PRAKTIČNA ISKUSTVA: Najbolje rezultate postiže pri niskom i povišenom sustavu uzgoja sa primjenom kratkog reza rodnoga drva. Rodnost je redovita i dobra. Količina sladora ovisno o položaju, opterećenju i tehnologiji uzgoja varira od 17-25% a koncentracija ukupne kiselosti od 6- 8.5 g/l. Vrlo slabe je otpornosti na sve bolesti.

ISKORIŠTENJE: Kultivar je visokoga genetskog potencijala pa se ovisno o tehnologiji uzgoja, opterećenju i tehnologiji prerade mogu dobiti vina u kategorijama od kvalitetnih do prirodno desertnih vina. Jedno je od najcjenjenijih vina hrvatskoga juga.

Chardonnay

SINONIMI: Chardenet, Chaudenet, Pinot blanc a cramant, Arnaison blanc, Maconnais, Aubain, Weis Klewner, Pinot chardonnay, Pinot Giallo, i dr.

PODRIJETLO I RASPROSTRANJENOST: potječe iz Francuske, gdje je i najviše rasprostranjen, a uzgaja se manje više u svim vinorodnim zemljama umjerene i hladne klime. Nastao je kao spontani križanac sorte Gauois blanc i Pinot Noir.

BOTANIČKA OBILJEŽJA; Vršci mladica su pahuljasti, bjelkasti.

Cvijet je morfološki i funkcionalno dvospolan.

Odrasli list je okrugao, srednje velik. Sinus peteljke je otvoren, u obliku slova „U“, više ili manje ogoljelih rebara na dnu. Trodjelan je, peterodjelan ili cjelovit. Postrani sinusi su vrlo nejednaki, često manjkaju uopće ili postoje samo sa jedne strane. Lice je golo, a naličje sa rijetkim paučinastim dlačicama. Plojka je neravna, hrapava ili mjehurasta. Lice je

zeleno, zagasito, naličje je blijeđe. List je dosta debeo. Zupci su nejednaki, mali, tupi, na kraju glavnih rebara dulji i oštriji.

Zreo grozd je srednjevelik do malen, zbijen, valjkast, kratak, obično jednostavan. Peteljka grozda je srednje duga, do polovine drvenasta.

Zrele bobice su srednjevelike do male, žućkastobijele, okruglaste ili malo duguljuste. Kožica je tanka, oprašena, prozirna. Meso je sočno, slatko.

Rozgva je srednje duga. Članci su srednje dugi ili kratki, kora blijedo-crvenosmeđa, ljubičasto oprašena, osobito na koljencima, s rijetkim čađastim mrljama.

Srednje bujna sorta.

FENOLOŠKA OBILJEŽJA: Nije osobito izbirljiv na položaj i tlo. U područjima hladne klime odgovaraju mu plodnija tla na nižim položajima dok u južnijoj klimi manje bujna tla na višim položajima. Dozrijeva rano u II. razdoblju prema Pulliatu.

PRAKTIČNA ISKUSTVA: Prikladan za različite sustave uzgoja. Reže se obično na dugo rodno drvo. Rodnost je mala do srednja, kao i kod drugih visokokvalitetnih sorata malih grozdova.

Tolerantnost prema smrzavicama je srednja, prema peronospori slabija nego prema Oidijumu. Grožđe u kišnoj jeseni trune.

ISKORIŠTENJE: Daje visokokvalitetno vino finoga sortnog mirisa i okusa, visokog sadržaja alkohola i osrednje kiselosti.

4.1.2 Biljni materijal i tkiva

4.1.2.1 *Analiza sjemenih zametaka, ženskog gametofita i analiza broja sjemnih zametaka*

Materijal za mikroskopsku analizu građe ženskoga gametofita bili su cvjetovi odnosno njihove plodnice sa sjemenim zametcima ili netom zametnuti plodovi određenih veličina (1-5 mm) te određenoga vremena protekloga od zametanja (1-7 dana). Materijal je prikupljen na vinogradarskom pokušalištu Agronomskog fakulteta. Dinamika razvoja bobica i sjemenih zametaka nakon oplodnje

Za istraživanje dinamike razvoja bobica uzeti su uzorci bobica u periodu od potencijalnog trenutka oplodnje dvanaest sati nakon opadanja kapice do dvadeset dana nakon oplodnje. Uzorci su prikupljeni sa trsova sorte Grk u kolekcijskom nasadu autohtonih sorata na pokušalištu Jazbina.

4.1.2.2 *Analiza građe peludi i klijavosti muškog gametofita*

Pelud testiranih sorata (Chardonnay, Plavac mali i Grk) je prikupljena u kolekcijskom nasadu autohtonih sorata na vinogradarsko-vinarskom pokušalištu u Jazbini.

4.1.2.3 *Fenološka kompatibilnost potencijalnih sorata oprašivača i Grka*

Sa ciljem utvrđivanja fenološke kompatibilnosti u promatranje su, osim Grka uzete sorte Plavac mali, Pošip bijeli i Chardonnay. Biljni materijal za praćenje činile su cvati u periodu od početka do kraja cvatnje.

4.1.2.4 *Određivanje kompatibilnosti sorata oprašivača i sorte Grk*

S ciljem analize kompatibilnosti potencijalnih sorata oprašivača bila je analizirana pelud sorata Plavac mali i Chardonnay u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Pored navedenih sorata u *in vivo* uvjetima uzeta je i sorta Pošip bijeli.

Pelud za analizu u *in vitro* uvjetima prikupljen je u kolekcijskom nasadu autohtonih sorata na vinogradarsko- vinarskom pokušalištu u Jazbini.

Pelud sorata Plavac mali i Pošip bijeli za analizu kompatibilnosti sorata oprašivača u *in vivo* uvjetima prikupljeni su u pokusnom nasadu na Baštici, dok je pelud sorte

Chardonnay s istim ciljem prikupljen u proizvodnom nasadu na vinogradarsko- vinarskom pokušalištu u Jazbini.

U *in vivo* uvjetima kao ispitivani materijal služili su cvatovi sorte Grk na pokusnom nasadu u Baštici. U periodu pune zrelosti grozdovi iz pokusa su ubrani te su služili kao materijal za analizu postotka oplođenih bobica sa sjemenkom.

4.1.2.5 *Utjecaj neoplođenih besjemenih bobica (pasolina) na kemijska svojstva grožđa i vina*

Kako bi se utvrdio kemijski sastav grožđa i vina korišteno je grožđe sorte Grk ubrano u punoj zrelosti tijekom dvije uzastopne godine (2011. i 2012.) u pokusnom nasadu Baštica. Nakon berbe od ukupne mase grožđa ručno su razvrstana tri uzorka od 50 kg ovisno o udjelu pasolina: manje od 20 % pasolina, zatim ii) većim od 80 %, te iii) sa podjednakim udjelom pasolina i bobica sa sjemenkom. U ovoj disertaciji za i) varijantu koristiti će se šifra P20, za varijantu ii) šifra P80 te za varijantu iii) šifra P50. Od ukupne mase grožđa 1 kg uzorka je izdvojena za daljnje laboratorijske analize kemijskog sastava grožđa i mošta, dok je ostatak bio namjenjen mikrovinifikaciji.

Uzorak za analizu polifenola u grožđu činile su sjemene bobice i pasoline prikupljene iz svake od triju varijanti pokusa. Iz uzorka je uzeto po 50 sjemenih bobica i isto toliko pasolina, nakon čega su uzorci zamrznuti do trenutka analize. U vrijeme analize bobice su odmrznute i odvojena je kožica od mesa. Polifenolni sastav analiziran je posebno na kožicama i u soku/moštu uzorka.

4.1.3 Pokusni nasadi

4.1.3.1 *Vinogradarsko- vinarsko pokušalište Jazbina*

Vinogradarsko-vinarsko pokušalište Jazbina se nalazi na valovito-brežuljkastom terenu južnih obronaka Zagrebačke gore. Tlo u pokusnom nasadu predstavlja antropogeni pseudoglej na matičnom supstratu diluvijalnih ilovina. Po teksturi je to glina, za poljoprivrednu proizvodnju prilično nepovoljnih fizikalnih i kemijskih svojstava. Reakcija tla je slabo kisela, a humoznost tla slaba ili vrlo slaba.

Uzorci u svrhu istraživanja građe muškoga i ženskoga gametofita prikupljeni su u kolekciji autohtonih sorata vinove loze. Nasad je podignut 2001. do 2003. godine kao Nacionalna kolekcija autohtonih sorata prikupljenih dugogodišnjom inventarizacijom i identifikacijom na području Republike Hrvatske. Razmak između redova u vinogradu je 2,1 m a razmak između redova je 1 m. Sorta Grk u kolekciji je zastupljena sa šest trsova. Trsovi su cijepljeni na podlogu SO4 (*Vitis berlandieri x Vitis riparia x*) a uzgojni oblik je jednostruki kordonac.

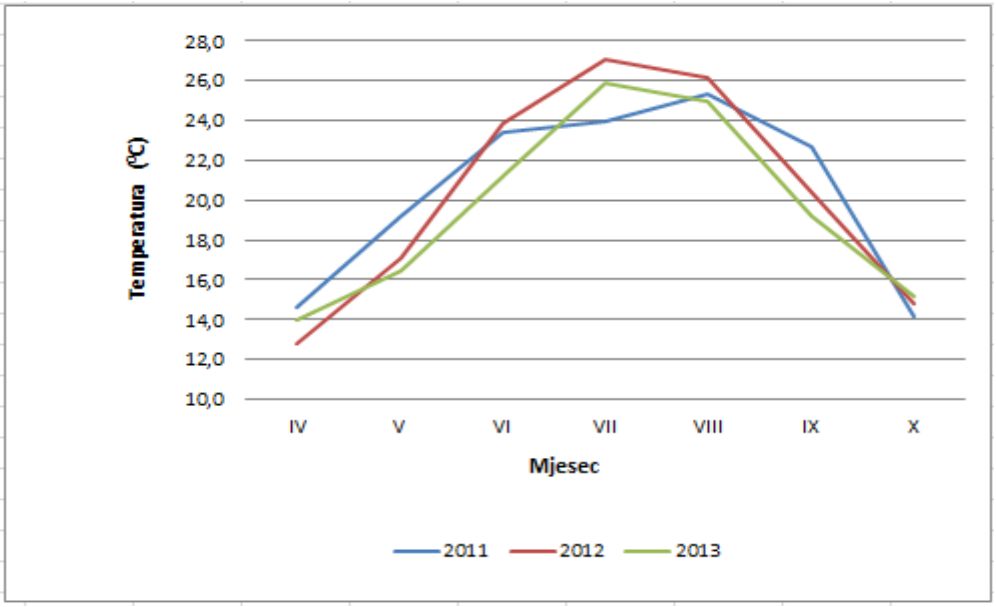
4.1.3.2 *Pokusni nasad Baštica*

Pokusi sa ciljem istraživanja utjecaja oprašivača na mehanički sastav grozda i kvalitetu grožđa i vina kod sorte Grk postavljeni su u pokusnom nasadu klonskih kandidata autohtonih sorata na Baštici pored Zadra. Pokusni nasad je podignut 2008 godine sa ciljem evaluacije klonskih kandidata autohtonih dalmatinskih sorata. Tlo na lokaciji Baštica je antropogeno, duboko, pjeskovito do pjeskovito-glinasto na eutričnim pješčenjacima te dobro opskrbljeno sa svim neophodnim makro i mikro elementima za normalan rast i razvoj vinove loze. U pokusnom nasadu pored sorata Plavina, Plavac mali, Maraština, Vugava, Pošip, Debit, Lasina nalazi se i Grk. Podloga je Kober 5BB (*V. berlandieri x V. riparia),* a svi klonski kandidati su slobodni od ekonomski najvažnijih virusa. Razmaci sadnje u pokusnom nasadu iznose 2,2 m između redova i 1,1 m unutar reda. Sustav uzgoja je jednostruki kordonac. U nasadu se provode uobičajni ampelotahnički zahvati. U pokusnom nasadu posađeno je 460 trsova od 37 klonskih kandidata sorte Grk.

4.1.4 Klimatske prilike

4.1.4.1 *Pokusni nasad Baštica*

Podaci o vremenskim prilikama dobiveni su od Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ), s meteorološke Zemunik koja je udaljena 10 km zračne linije od pokusnog nasada.

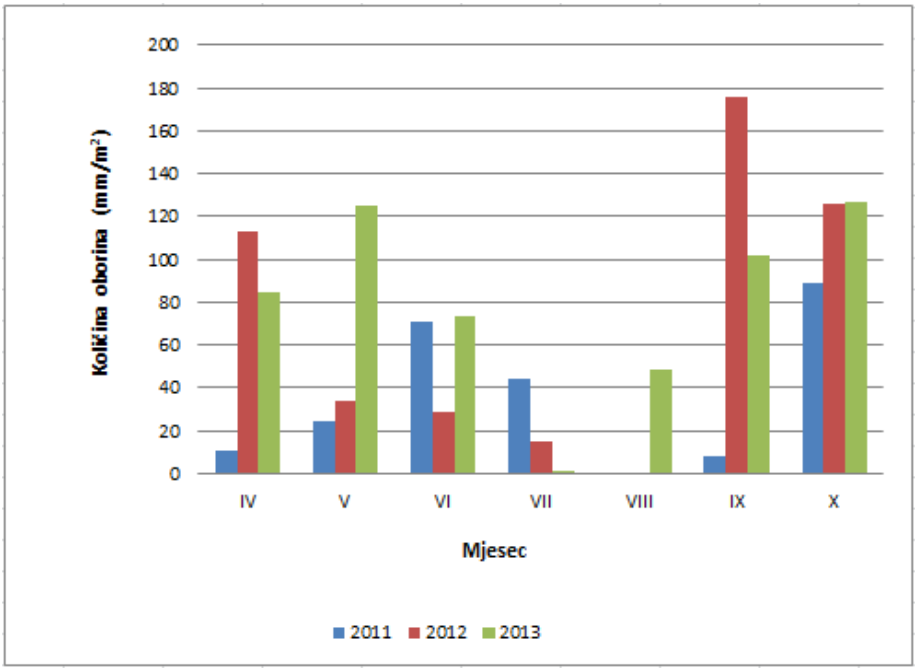


Graf 1. Srednje mjesečne temperature zraka u vegetaciji, Zemunik, 2011., 2012., 2013. god.

Iz Grafa 1. možemo vidjeti da je u promatranom razdoblju mjesec s najvišom prosječnom temperaturom u 2011. god. bio kolovoz sa temperaturom od 25,3 ^{0}C, dok je u 2012. i 2013. god. to bio srpanj sa prosječnom temperaturom od 27,1 ^{0}C, odnosno 25,9 ^{0}C. Najhladniji mjesec u vegetacijskom razdoblju u 2011. god. bio je listopad dok je u 2012. i 2013. god. to travanj sa prosječnom temperaturom 12,8 ^{0}C odnosno 14 ^{0}C.

Srednja godišnja temperatura je iznosila 2011. god. 15,0 ^{0}C, 2012. god. 15,0 ^{0}C, dok je 2013. god. iznosila 14,7 ^{0}C. Srednja vegetacijska temperatura bila je najviša 2011. god. i iznosila je 20,5 ^{0}C, dok je 2012. iznosila 20,3 ^{0}C, a 2013. god. 19,6 ^{0}C. Temeljem temperaturnih pokazatelja može se zaključiti da su sve tri godine bile povoljne za rast, razvoj i proizvodnju grožđa kod vinove loze. Pri tome se iz godišnjeg i vegetacijskog prosjeka može zaključiti da su 2011. i 2012. god. bile prema temperaturama bile vrlo ujednačene i toplije dok je 2013. bila nešto hladnija sa nižim prosjekom temperatura.

Usporedbom sa tridesetogodišnjim prosjekom (1971. - 2000. god.) na najbližoj postaji Zadar (prema Maletić i sur., 2008) gdje je prosječna godišnja temperatura iznosila 16,4 ^{0}C, može se zaključiti da ovo područje ima općenito nešto nižu prosječnu godišnju temperaturu.



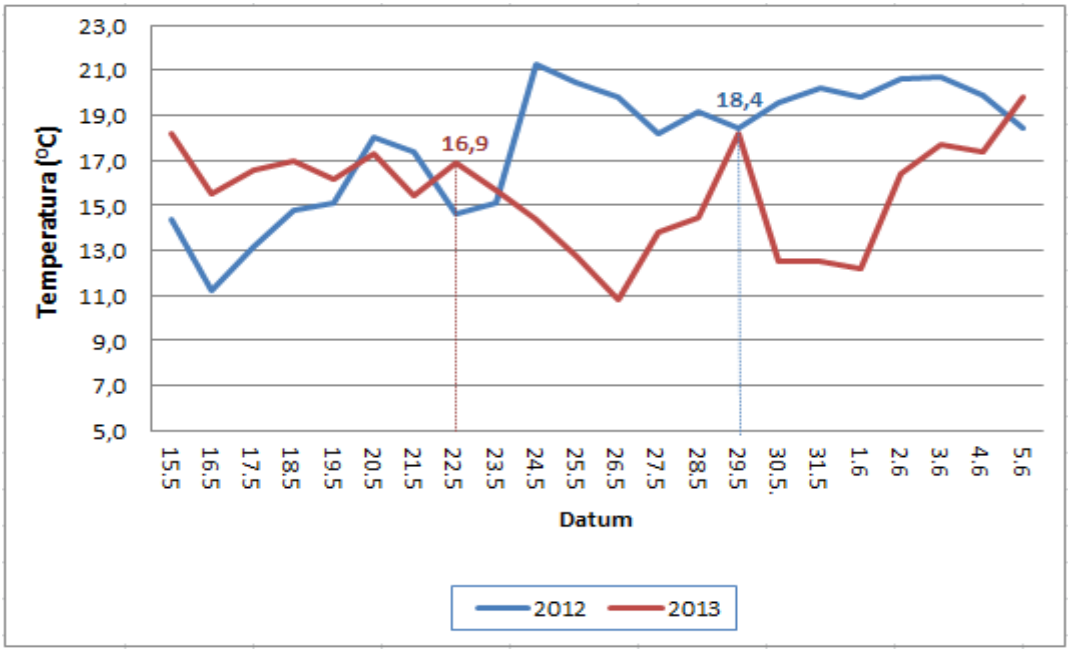
Graf 2. Oborine u vegetaciji, Zemunik, 2011., 2012., 2013. godinu.

Ukupna godišnja količina oborina (Graf 2) u 2011. god. iznosila je 420,7 mm, u 2012. god. 798,8 mm, a u 2013. god. 1202,0 mm. Ukupna količina oborina u vegetaciji u 2011. god. iznosila je 247,2 mm, dok je u 2012. god. izmjereno 492,2 mm, a u 2013. god. 562,6 mm.

Iz navedenih vrjednosti ukupnih količina oborina može se zaključiti da je apsolutno najmanja količina oborina izmjerena u 2011. godini dok je najviša izmjerena u 2013. godini. Uspoređujući ove rezultate s tridesetogodišnjim prosjekom padalina (1971. - 2000. god.) na najbližoj postaji Zadar bio je 879,2 mm (Maletić i sur., 2008) možemo zaključiti da je 2011. god. bila značajno ispod prosjeka, 2012. godina je bila približno prosječna, dok je 2013. bila značajno iznadprosječna sa padalinama. Isti trend prate i vrijednosti oborina u periodu vegetacije.

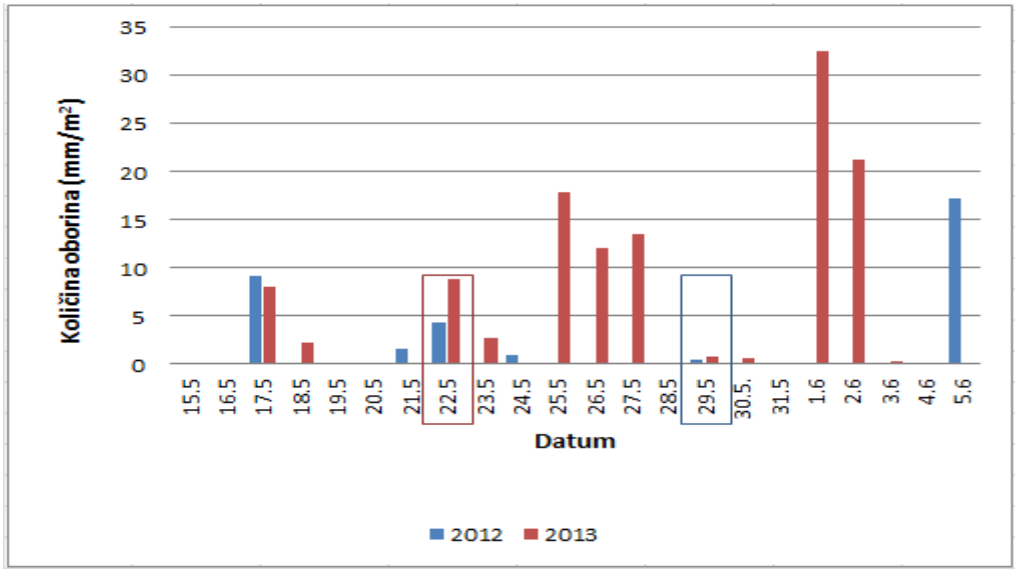
Temeljem svega navedenog možemo zaključiti da su klimatske prilike općenito bile povoljne za uzgoj vinove loze i dozrijevanje grožđa u 2011. i 2012. god., dok su 2013. god zbog niže vegetacijske temperature ali prvenstveno zbog iznimno visokih vrijednosti količine oborina bile izrazito nepovoljne.

Osim na ukupni godišnji ciklus rasta i razvoja vinove loze i proces dozrijevanja grožđa temperatura i oborine mogu imati značajan utjecaj u periodu cvatnje i oprašivanja. Ovaj period se u pravilu odnosi na kraj svibnja i početak lipnja.



Graf 3. Srednje dnevne temperature zraka u periodu cvatnje, Zemunik, 2012. i 2013. god.

Kako je vidljivo iz Grafa 3., srednja dnevna temperatura u vrijeme provođenja pokusa induciranog oprašivanja bila je u 2012. god. 16,9 ^{0}C dok je u 2013. iznosila 18,4 ^{0}C. Ove temperature predstavljaju optimalne vrijednosti za uspješno odvijanje procesa oprašivanja i oplodnje. Kao ukupni period od početka cvatnje do kraja cvatnje uzeo sam u obzir vrijeme pet dana prije trenutka oprašivanja i pet dana nakon trenutka oprašaivanja. Trenutak oprašivanja a time i pune cvatnje u 2012. bio je 29.5. a u 2013. 22.5.. Prosječna temperatura u tom razdoblju od deset dana u 2012. god. iznosila je 19,8 ^{0}C a u 2013 15,2 ^{0}C. Prema navedenom može se zaključiti da je 2012. god. bila povoljnija za period za proces cvatnje i oplodnje na ovom području.



Graf 4. Oborine u periodu cvatnje, Zemunik, 2012. i 2013. god.

Prema Grafu 4. u obje godine pokusa zabilježene su oborine u periodu pune cvetnje. Tako je u trenutku oprašivanja u 2012. god. zabilježeno 0,4 mm oborina dok je u 2013. zabilježeno 8.8 mm oborina. Tijekom čitavoga razdoblja cvatnje u 2012. zabilježeno je ukupno 0,4 mm padalina a u 2013. god. 9,3 mm.

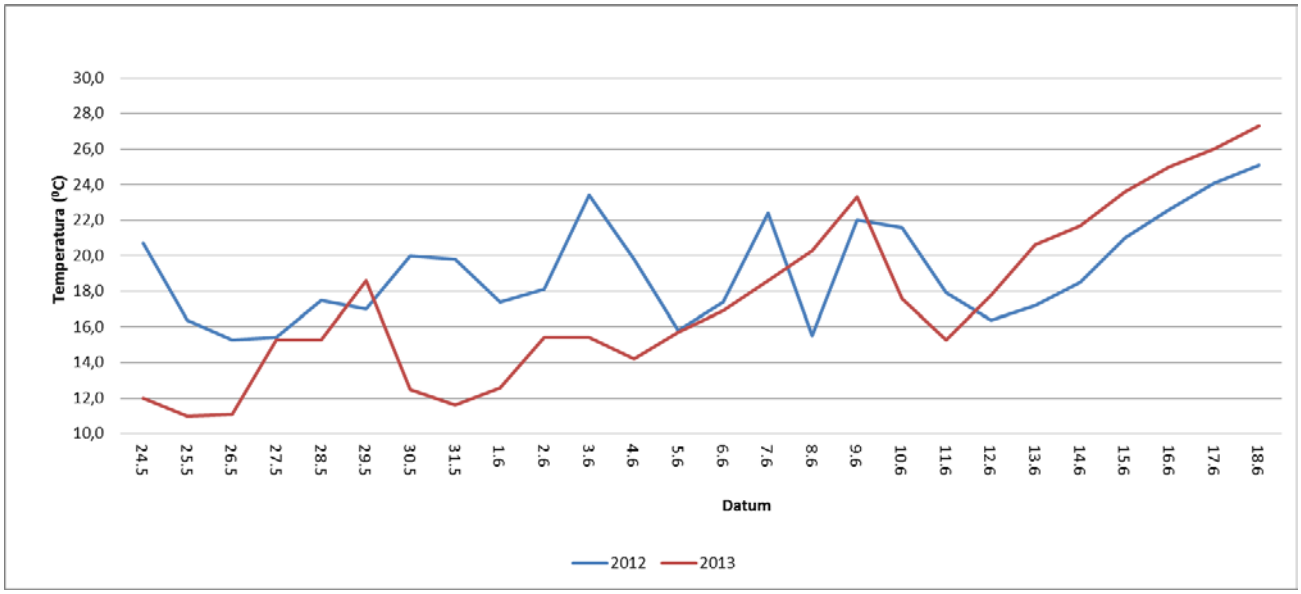
Ukupno gledajući, period cvatnje u 2012. obilježen je višom prosječnom temperaturom zraka kao i značajno nižim oborinama, pa su uvjeti za procese oprašivanja i oplodnje bili puno povoljniji. U 2013. godini prosječna temperatura u tom periodu bila je niža sa značajnim oborinama, što se u pravilu nepovoljno može odraziti na procese oprašivanja i oplodnje.

4.1.4.2 *Pokušalište Jazbina*

Klimatske prilike na pokušalištu Jazbina (podaci ustupljeni od Državnog hidrometeorološkog zavoda) uzete su u obzir tijekom 2012. i 2013. godine i to za period od 24. svibnja do 18. lipnja. Tijekom navedenog perioda započela je i završila cvatnja kod sorata Grk, Plavac mali, Pošip bijeli, Chardonnay kod kojih je praćena fenološka podudarnost u vremenu cvatnje.

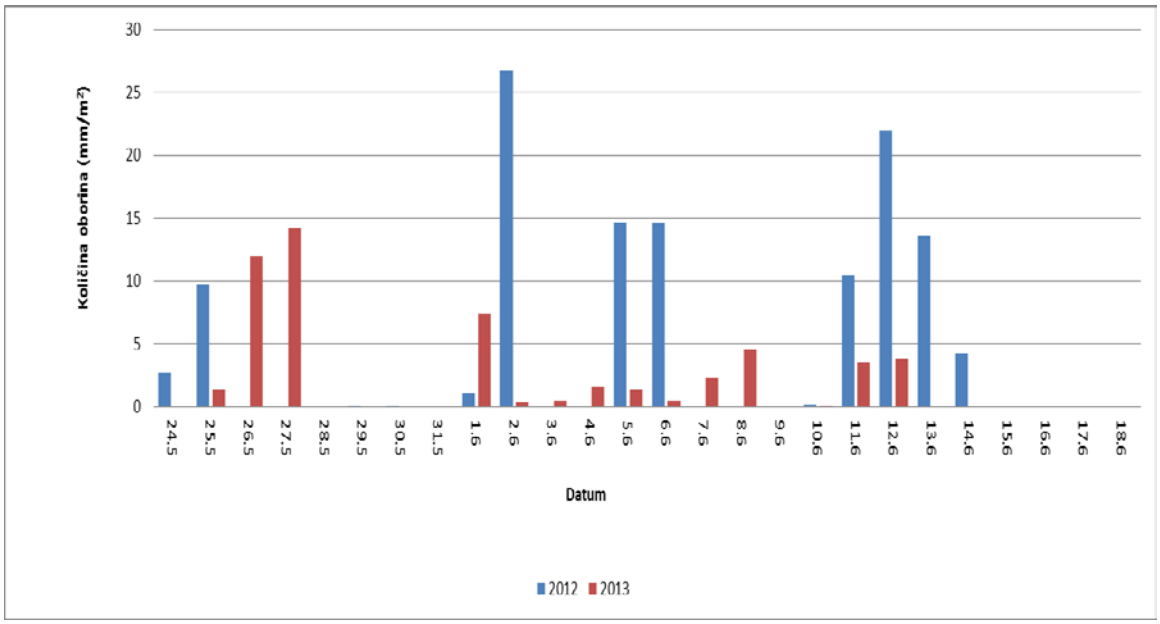
Srednja dnevna temperatura tijekom peroda cvatnje (Graf 5) u 2012. bila je 19,2 ^{0}C dok je tijekom 2013 iznosila 17,5 ^{0}C. Najniža dnevna temperatura tijekom 2012. god. iznosila je 15,3 ^{0}C a najviša 25,1 ^{0}C. Tijekom 2013 zabilježen je nešto niži minimum srednje dnevne temperature na početku cvatnje od 11 ^{0}C dok je dnevni maksimum postiknut pred kraj cvatnje a iznosio je 27,3 ^{0}C.

Iz navedenoga se može zaključiti da jsu dnevne temperature bile optimalne za procese cvatnje. Tijekom 2013. godine pojava nešto nižih dnevnih minimuma (24.5.2013- 12^{0}C, 25.5.2013- 11 ^{0}C, 26.5.2013- 11,1 ^{0}C te 31.5.2013- 11,6^{0}C) mogla je pogodovati produljenom periodu cvatnje.



Graf 5. Srednje dnevne temperature zraka u periodu cvatnje, Maksimir, 2012. i 2013. god.

Analizom količine oborina (Graf 6) u periodu cvatnje utvrđeno je da je tijekom cvatnje u 2012. god. bilo ukupno 120,3 mm dok je u 2013. god. ukupna količina oborina iznosila 53,8 mm. Prema navedenim rezultatima vidljivo je da je tijekom 2012. god. palo znantno više oborina što je moglo utjecati na produljenje period cvatnje.



Graf 6. Oborine u periodu cvatnje, Maksimir, 2012. i 2013. god.

4.2 Metode

4.2.1 Analiza sjemenih zametaka i ženskog gametofita

Razvoj ženskog gametofita bio je praćen tijekom sezone 2012. na kultivaru vinove loze Grk te na kontrolnim sortama Chardonnay i Plavac mali. Cilj analize bio je utvrditi građu sjemenog zametka i ženskog gametofita neposredno prije i nakon oplodnje, kao i faze razvoja embrija u periodu nakon oplodnje.

Materijal za analizu, cvjetovi i netom zametnuti plodovi uzimani su u sljedećim fazama razvoja: neotvoreni cvjetovi, netom otvoreni cvjetovi te cvjetovi otvoreni u rasponu od jedan do deset dana od trenutka otvaranja.

Na osnovi vanjskih morfoloških pokazatelja temeljenih na literaturnim podacima (Vasconcelos i sur., 2009; May, 2004; Pratt, 1971) definiran je trenutak koji predstavlja ishodišnu točku za početak razvoja bobice nakon oplodnje. Kao trenutaka oplodnje uzeta je pojava tamnjenja njuškice tučka iz svjetle u smeđu do crnu boju, te tamnjenje prašnica iz svjetlo žute u smeđu boju.

Plodnice su analizirane binokularnom lupom povećanja 0,65 do 2 puta (Zeiss Stemi 2000-c) s nadograđenom kamerom AxioCom ERc5s, te sustavom za obradu slika AxioVision4, bez prethodne obrade materijala. Bobice su usporedbom na milimetarskom papiru razvrstane u kategorije prema najširem promjeru (Tablica 2).

Tablica 2. Kategorije veličina plodnica

Kategorije uzorkovanja	**Sorta**		
	Grk	Plavac mali	Chardonnay
Cvijet prije otvaranja	G_1	P_1	Ch_1
Promjer plodnice 1-2 mm	G_2	P_2	Ch_2
Promjer plodnice 2-3 mm	G_3	P_3	Ch_3
Promjer plodnice 3-4 mm	G_4	P_4	Ch_4
Promjer plodnice 4-5 mm	G_5	P_5	Ch_5

Nakon kategoriziranja bobice su pripremane za analizu građe sjemenih zametaka, ženskog gametofita kao i embrionalnog razvoja nakon oplodnje.

4.2.1.1 *Priprema trajnih mikroskopskih preparata sjemenih zametaka*

Priprema mikroskopskih preparata obuhvaća postupke: 1) fiksacije preparata; 2) dehidriranja i uklapanja u parafinske blokove, 3) rezanja parafinskih blokova na mikrotomu te 4) završnu fazu rehidriranja, bojanja biljnog tkiva i uklopa kao pripremu za mikroskopiranje.

Prvi korak ili fiksacija služi kako bi se biljno tkivo sačuvalo tj. stabilizirao međusobni odnos staničnih struktura kako bi što više sličile uvjetima u živoj stanici. Procesom fiksacije zaustavlja se enzimska razgradnja – autoliza, izazvana staničnim enzimima i putrefakcija, izazvana enzimima saprofitnih bakterija. Tijekom fiksacije denaturiraju se enzimski i strukturni proteini dok druge tkivne molekule ne podliježu promjeni (Glavina-Durdov, 2009.). Fiksativ korišten u ovom istraživanju predstavlja modificiranu FAA otopinu (od eng. "formalin-acetic acid-ethil alcohol“) slijedećeg sastava: formaldehid (2 mL), 50%-tni etanol (90 mL) i octena kiselina (5 mL). Biljni materijal je u fiksativu odstajao 24 sata. Nakon fiksacije potrebno je iz tkiva ukloniti vodu postupkom dehidracije. Uklanjanje vode je nužno jer u kasnijim postupcima tamo gdje ona zaostane ne može prodrijeti parafin. Kako bi se spriječilo oštećenje tkiva dehidracija mora biti postupna, prenošenjem tkiva kroz rastuće koncentracije dehidrirajuceg sredstva (Glavina-Durdov, 2009.), najčešće alkohola etanola. U ovom istraživanju postupak dehidracije se provodio tijekom dvadeset minuta postupnim provođenjem tkiva kroz etanol početne koncentracije 50 %, zatim 70 %, te na kraju 96 %. Nakon toga tkivo se se stavlja u otapalo za parafin, u mojem slučaju ksilol

Nakon fiksacije slijedeća faza u pripremi tkiva je uklapanje u parafin. Svrha uklapanja je tkivo skrutnuti i ispuniti materijalom pogodnim za rezanje na uređaju za rezanje tankih (6-8 μm) presjeka - mikrotomu. Tako se dobivaju tanki presjeci tkiva koji sadrže samo nekoliko slojeva stanica pa su stoga pogodni mikroskopiranje. Najpogodniji materijal za uklapanje tkiva je sintetski parafin (Paraplast P3683, Sigma).

Uklapanje tkiva u ovom istraživanju obavljeno je prema protokolu preuzetom s poveznice www.molecularinfo.com/MTM/J/J2/J2-1/J2-1-2.html (Copy Right © 2001/ Institute of Molecular Development LLC). Nakon uklapanja biljnog tkiva u parafinske blokove i hlađenja pristupa se rezanju tkiva na mikrotomu. Parafinski rezovi se po rezanju „peglaju“ na vodenoj kupelji i potom lijepe na predmetna stakalca i suše.

Zadnji korak prije mikroskopiranja je priprema rezova za bojenje pri čemu je prvo iz tkiva potrebno istisnuti parafin kako bi se tkivo moglo obojiti bojama. Kako bi se iz tkiva istisnuo parafin preparati se uranjaju u ksilol koji je otapalo za parafin. Ispiranje traje

petnaest minuta, a odvija se u posebnim kadicama s utorima u koja se potapaju predmetna stakalca s rezovima biljnog tkiva. Nakon tretiranja ksilolom tkivo se rehidrira kroz padajuće koncentracije etanola (od 96%-tnog etanola do 50%-tnog etanola). Neposredno prije mikroskopiranja preparati se po potrebi tretiraju reagensom „DAPI“ (4′,6-Diamidin-2′-fenilindol dihidroklorid). Navedeni reagens ima fluorescentni karakter a unutar stanice prijanja uz molekulu DNA, osobito za one dijelove koje su bogate AT parom nukleotida (http://www.biolegend.com/dapi-4%276-diamidino-2-phenylindole-dilactate). Na jedan rez biljnog tkiva na jednom predmetnom stakalcu stavi se po kap navedenog bojila koncentracije 10 µg/ml.

4.2.1.2 *Mikroskopiranje*

Fenotipska analiza sjemenih zametaka, ženskog i muškog gametofita napravljena je upotrebom invertnog flourescencijskog mikroskopa Zeiss Axiovert 200M, nadograđenom sustavom za mikromanipulaciju (Narishige) i mikrodisekciju te kamerom AxioCamMRC uz upoterbu paketa za obradu AxioVision (AxioVisionimaging software version 4.5).

Koristeni filteri imali se sljedeće ekscitacijske valne duljine i emisijske filtere:

Filter 02 (Zeiss) za DAPI - ekscitacija 365 nm, emisija LP420,

Filter 14 (Zeiss) za bojanje propidij jodidom - ekscitacija BP 510-560 nm, emisija LP590.

4.2.2 Analiza broja sjemenih zametaka kod sorta Grk, Plavac mali i Chardonnay

Na dvadeset bobica iz svake od ranije navedene kategorije (Tablica 2) analiziran je i utvrđen udio bobica s određenim brojem sjemenih zametaka.

4.2.3 Dinamika razvoja bobica i zametaka sjemenke sorte Grk nakon oplodnje

Osim mikroskopske analize plodnica i sjemenih zametaka u sorte Grk utvrđena je i dinamika razvoja bobica dvadeset dana nakon oplodnje. Uzorci bobica su uzimani u koleciji autohtonih sortata na Jazbini svakih pet dana počevši od trenutka oplodnje. Za analizu dinamike rasta pasolina uzorci su skupljani s tri grozda kod kojih je izvršena izolacija cvatova prije cvatnje, dok su sjemene bobice uzorkovane sa tri grozda koji su u vrijeme pune cvatnje ciljano oprašeni polenom sorte Chardonnay. Svi grozdovi nalazili su

se na istom trsu. Uzorak je činio uzorak od ukupno dvadeset bobica nasumično skupljenih sa tri grozda

Mjerenjem je utvrđen promjer bobice, broj, prisutnost i veličina zametnutih sjemenki odnosno zakržljalih sjemenih zametaka u svakoj promatranoj fazi.. Pri analizi je posvećena pažnja uočavanju razlika u promjeru bobica i veličini zametnutih sjemenih bobica i pasolina sorte Grk.

Ovi uzorci također su analizirani binokularnom lupom povećanja 0,65 do 2 puta (Zeiss Stemi 2000-c) s nadograđenom kamerom AxioCom ERc5s te sustavom za obradu slika AxioVision4, bez prethodne predobrade materijala.

4.2.4 Analiza građe peludi i klijavosti muškog gametofita

Metode istraživanja građe muškoga gametofita odnose se na ispitivanje građe peludnih zrnaca. Pritom je bilo važno utvrditi postojanje jezgara unutar peludnoga zrnca kao i građu stijenke zrnca. Pelud za istraživanje izolirana je iz prašnica cvjetova u periodu pune cvatnje testiranih sorata.

Klijavost peluda testirana je naklijavanjem na tekucim podlogama sastava 40% otopina saharoze uz dodarak 200 mg/l borne kiseline te 600 mg/l kalcijevog nitrata ($CaNO_3$). Kap otopine stavljena je na predmetno stakalce te su u nju nanesena peludna zrnca, laganim otresanjem iz zrele prasnice. Nakon hidratacije preparat je pokriven pokrovnim stakalcem i ostavljen u vlaznoj komorici do analize. Procjena klijavosti utvrđena je nakon dvadeset minuta te nakon dvadeset sati.

Metode istraživanja građe peludovih zrnaca zasnivaju se na bojenju preparata bojama koje pod određenim uvjetima emitiraju fluorescentnu svijetlost. Boje koje su korištene u istraživanju su Fluorescein diacetat (FDA) i propidij jodid (PI). FDA predstavlja nefluorescentnu boju koja ulazi u žive stanice u kojima u reakciji s esterazama u citoplazmi prelazi u fluorescentnu molekulu fluorescein (Cell staining protocol, www.dojindo.com).

Molekule propidij jodida snažno reagiraju sa molekulom DNA posljedica čega je snažno obojenje jezgri stanica. Nedostatak bojanja PI-om je u tome što boja ulazi samo u odumrle stanice jer membrane žive stanice ne dozvoljavaju prolaz molekula PI. Obojenje propidij- jodidom na mikroskopu se uočava kao crveno obojenje. PI (vodena otopina koncentracije 100 µg/ml) i FDA (5 mg/ml otopljeno u acetonu) dodavani su peludnim

zrncima koja su kultivirana na podlozi za klijanje na predmetnom stakalcu. Promatranje je odrađeno nakon 20 minuta na binokularnom mikroskopu Zeiss Axiovert 200M.

4.2.5 Određivanje kompatibilnosti sorata oprašivača i sorte Grk

4.2.5.1 *Fenološka kompatibilnost potencijalnih sorata oprašivača i Grka*

Fenološka kompatibilnost sorata bila je praćena na primkama sorata Grk, Plavac mali, Pošip bijeli i Chardonnay u sklopu kolekcijskog nasada autohtonih sorata vinove loze na Jazbini te sorte Chardonnay iz proizvodnog nasada na istom pokušalištu. Metodologija praćenja odrađena je prema BBCH skali koja predstavlja standardnu metodu za praćenje fenofaza svih mono i dikotiledonskih biljnih vrsta. Metoda se temelji na vizualnoj procjeni pojedinih fenofaza. Za praćenje u mom istraživanju uzeta je osnovna fenofaza razvoja br. 6- cvatnja vinove loze unutar koje se nalazi više kategorija vrijednosti (Tablica 3). Praćenje je odrađeno tijekom 2012. i 2013. godine.

Tablica 3. Kategorije fenofaze cvatnje prema BBCH skali

Osnovna fenofaza razvoja br. 6: cvatnja	
Kategorija:	*Opis pojave:*
60	Uočena prva odvojena kapica od stapke
61	Početak cvatnje- 10 % otvorenih cvjetova
63	Rana faza cvatnje- 30 % otvorenih cvjetova
65	Puna cvatnja- 50 % otvorenih cvjetova
67	Kasna faza cvatnje- 70 % otvorenih cvjetova
69	Kraj cvatnje

Promatrani uzorak iznosio je šest cvati sa tri trsa. Svaki grozd nalazio se na drugoj mladici te smješten najbliže stablu.

Prema navedenoj kategorizaciji za utvrđivanje kompatibilnosti cvatnje utvrđeni su datumi kada su navedene sorte bile u kategoriji 65. Statistička anliza kod istraživanja fenološke kompatibilnosti nije provedena iz niza razloga: u obzir je uzet mali broj uzoraka, te su klimatske prilike znatno drugačije od onih unutar regija gdije se sorte pretežno uzgajaju.

4.2.5.2 *Utjecaj izbora oprašivača na udio sjemenih bobica i kemijski satav grožđa*

Određivanje kompatibilnosti sorata oprašivača na udio sjemenih bobica i kemijski satav grožđa i sorte Grk provedeno je tijekom dvije godine (2012, 2013). Deset dana prije cvatnje na 40 nasumično odabranih trsova sorte Grk provedena je izolacija cvatova (Slika 5). Na svakome trsu izolirana su četiri cvata najbliža bazi mladice. Izbor mladica bio je nasumičan. Izolacija grozdova provedena je postavljanjem i učvršćivanjem papirnatih vrečica oko grozdova kako tijekom cvatnje ne bi došlo do nekontroliranog oprašivanja peludom neželjenih sorata.

U vrijeme pune cvatnje vrećica je otvorena pa kistom nanešen svježi pelud prikupljen sa sorata oprašivača. Na svakom trsu po jedan grozd je oprašen jednom od sorata, dok se četvrti grozd ostavi u uvjetima izolacije, bez oprašivanja i predstavlja kontrolu. Pelud sorte Chardonnay prikupljen je isti dan u ranim jutarnjim satima sa trsova u nasadima vinogradarsko-vinarskog pokušališta Jazbina u Zagrebu, te u prijenosnom hladnjaku prenesen u nasad u Zadar. Pelud sorata Pošip i Plavac mali prikupljeni su u samom pokusnom nasadu u Baštici. Nakon provednog oprašivanja vrećica je zatvorena i ostavljena na grozdu nekoliko tjedana nakon završetka cvatnje. Zatim su skinute kako bi se grozdovi mogli nesmetano razvijati.

U vrijeme berbe odnosno u vrijeme pune zrelosti grožđa materijal je prikupljen za analizu. Analiza je uključivala određivanje broja sjemenih bobica po grozdu i broj sjemenki po bobici, te osnovnu kemijsku analizu sjemenih bobica i pasolina. Uzorak za osnovnu kemijsku analizu činilo je pedeset sjemenih bobica i pedeset malih bobica, pasolina, na svakoj od varijanata oprašivanja. Osnovne kemijske analize obuhvaćaju: određivanje sadržaja šećera refraktometrom, određivanje ukupne kiselosti u moštu (g/l) titracijom s 0,1 M NaOH do točke neutralizacije određene indikatorom bromtimol plavim te pH vrijednost pomoću pH metra.



Slika 5. Izolirane cvati sorte Grk nakon oprašivanja sortama Plavac mali, Pošip i Chardonnay. Pokusni nasad Baštica.

4.2.6 Utjecaj udjela pasolina na kemijska svojstva grožđa i vina

4.2.6.1 *Kemijski sastav mošta i vina i organoleptičko ocjenjivanje vina*

Osnovna kemijska analiza mošta uključivala je sadržaj šećera, kiselina i pH na uzorku mošta za vinifikaciju od svake varijante. Sadržaj šećera određen je refrakometrijskom metodom, sadržaj kiselina određen je titracijskom metodom korištenjem 0,1M NaOH, a pH vrijednost određena je uz pomoć pH-metra.

Osnovna kemijska analiza vina provedena je prema službenoj metodi Međunarodne organizacije za lozu i vino (O.I.V.) 2007. Ova analiza uključuje utvrđivanje sadržaja volumnog postotka alkohola, sadržaj nehlapivih kiselina, sadržaj hlapivih kiselina, sadržaj neprevrelog šećera, ukupni ekstrakt bez šećera i kiselina, pH te sadržaj pepela. Kao primarni faktori koji su istraživani u ovoj disertaciji su sadržaj nehlapivih kiselina, ukupni ekstrakt bez šećera i kiselina, pH te sadržaj pepela iz razloga jer je njihov sadržaj primarno vezan uz karakteristike sirovine i značajno utječu na organoleptična svojstva vina.

Organoleptičko ocjenjivanje vina odrađeno je metodom sto bodova koja je propisana kao službena prema Međunarodnoj organizaciji za lozu i vino (O.I.V.). Senzornu analizu vina proveo je panel od deset licenciranih degustatora.

4.2.6.2 *Mikrovinifikacija*

Vinifikacija je provedena u eksperimentalnom podrumu na vinogradarsko-vinarskom pokušalištu Jazbina na Agronomskom fakultetu. Tehnologija prerade grožđa bila je uobičajena- što uključuje runjenje, muljanje i prešanje grožđa. Mošt koji je dobiven preradom tretiran je dodatkom 5 %-tne otopine sumporaste kiseline u koncentraciji 50 mg/l SO_2/l mošta. Mošt se nakon toga taložio 24 sata na temperaturi 16 ^{0}C nakon čega je rastočen u tri staklene posude od 15 litara koje predstavljaju tri repeticije. U navedenim posudama se provodila fermentacija uz pomoć selekcioniranih kvasaca (*Saccharomyces bayanus*, trgovačkog naziva „Lalvin EC 1118“.). Nakon završene fermentacije vino je pretakanjem odvojeno sa taloga u staklene posude manje zapremine (10 l) te dodatno konzervirano 5%- tnom otopinom sumporaste kiseline (konc. 50 mg/l SO_2/100 l vina). Nakon dva mjeseca provedene su analize vina. Isti postupak odrađen za sve tri varijante pokusa.

4.2.6.3 *Određivanje sadržaja polifenolnih spojeva u moštu i vinu*

Osim osnovnih kemijskih analiza mošta u bobicama i pasolinama provedena je i analiza sadržaja polifenolnih spojeva. Od polifenola utvrđene su sljedeće grupe spojeva: neflavonoidi (spojevi iz skupina hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina), flavonoidi (spojevi iz skupine flavan-3-ola i flavonoli) te resveratrol, spoj iz skupine stilbena. Ovi spojevi ujedno predstavljaju i najčešće spojeve u bijelom vinu. Analiza polifenolnog sastava napravljena je i na vinima dobivenom vinifikacijom svake varijante pokusa. Statistička usporedba navedenih spojeva napravljena je na razini pojedinačnih spojeva kako bi se utvrdile razlike između sadržaja u kožici, mesu bobica i vinu (varijantama vinifikacije). Na osnovi sume pojedinačnih spojeva utvrđena je ukupna koncentracija grupe spojeva te ukupna koncentracija polifenola za sjemene bobice te pasoline te dobivena vina. Usporedbom ukupnih koncentracija utvrđena je razlika između bobica i pasolina te između triju varijanata vina.

Sadržaj pojedinačnih polifenola u dobivenim ekstraktima iz kožica određen je RP-HPLC metodom (Berente i sur. 2000.) pomoću HPLC instrumenta Agilent 1100 Series (Agilent, 71
SAD). Odvajanje polifenola provedeno je na Phenomenex Luna Phenyl-hexyl koloni (250 x 4,6 mm, Phenomenex, SAD) uz gradijentno eluiranje korištenjem 0,5 % (v/v) vodene otopine fosforne kiseline (otapalo A) dok se kao otapalo B koristila otopina koja je sadržavala acetonitril:vodu:fosfornu kiselinu (50:49,5:0,5; v/v/v) s brzinom protoka od 0,9 mL/min. Tijekom analize su korišteni slijedeći uvjeti: volumen ubrizganog uzorka 20 µL,

temperatura kolone 50°C. Hidroksibenzojeve kiseline detektirane su pri valnoj duljini od 280 nm, p-hidroksicimetne kiseline pri 320 nm te flavonoli pri 360 nm. Flavan-3-oli su određeni primjenom fluorescencijskog detektora pri λ_{ex}= 225 nm i λ_{em}= 320 nm. Identifikacija pikova temeljila se na usporedbi vremena zadržavanja komponenti iz uzorka sa vremenima zadržavanja kao i usporedbom s UV spektrima standarada, dok je za kvantifikaciju korištena metoda vanjskog standarda. Mjerne jedinice u kojima su izražene vrijednosti su mg/kg svježeg uzorka (mg/kg s.u.) kod analize mesa i kožice bobica te mg/l vina kod analize vina.

4.2.7 Statistička analiza

Statističke metode koje se primjenjuju u svim pokusima su:

- Analiza varijance kako bi se utvrdile postoje li značajne razlike između varijanata pokusa kod svih analiziranih parametara.
- Usporedba srednjih vrijednosti provest će se korištenjem *Duncan's multiple range* testa.
- Personov koeficijent korelacije između udjela bobica sa sjemenkama u grozdu i osnovnih parametara kemijskog sastava mošta (sadržaj šećera, kiselina i pH vrijednost)

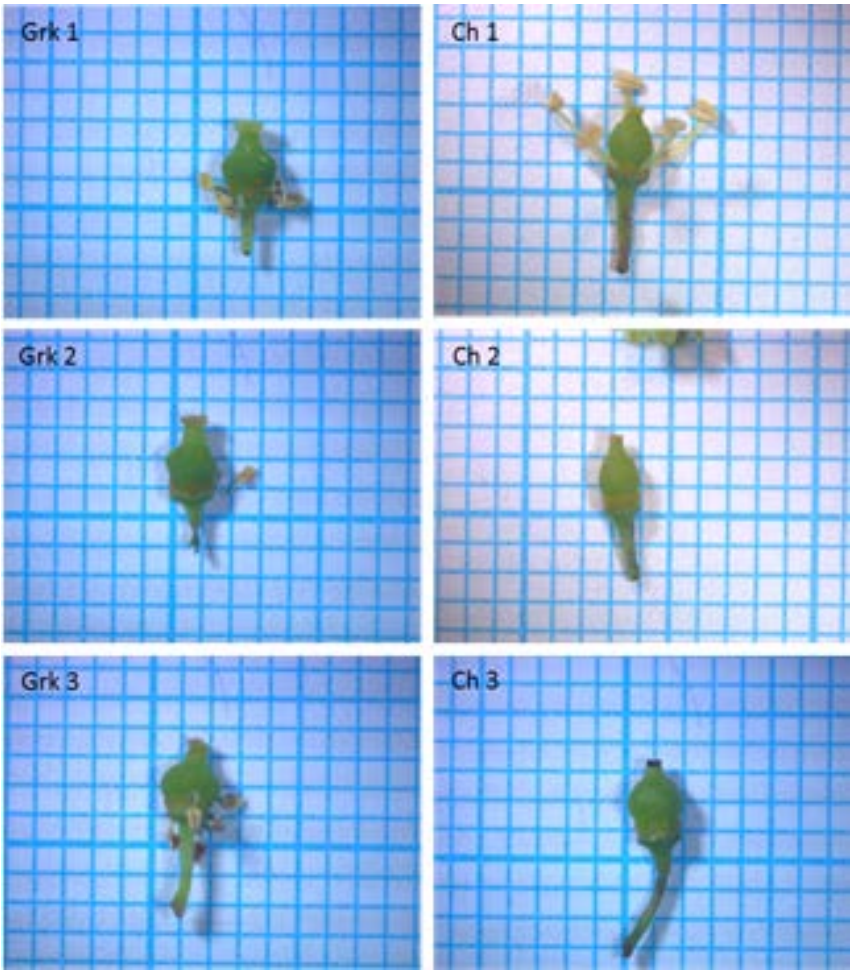
Statistička obrada podataka je napravljena u programu SAS 9.3.

5 REZULTATI

5.1 Izgled i veličina plodnica neposredno prije i nakon oplodnje

Analizom cvjetova sorte Grk u trenutku pune cvatnje utvrđeno je da su cvjetovi svih sorata u trenutku pucanja i ispadanja kapice sadržavali normalno razvijen tučak. Njuškica tučka kod svih cvjetova bila je tipične žućkaste boje i sa pojavom sekreta. Tri dana nakon otvaranja cvijeta njuškica je potamnila (Slika 6.). Prašnice su prilikom otvaranja cvijeta u sorata Plavac mali i Chardonnay bile tipične građe za hermafroditne cvjetove vinove loze, dok su u sorte Grk bile tipične građene za morfološki hermafroditni a funkcionalno ženski cvijet sa povijenim prašnicama. Prašnice su u svih sorata prilikom otvaranja cvijeta bile karakterestične žute do svjetlosmeđe boje te su nakon tri dana posmeđile i u većini slučajeva otpale (Slika 4.). Najširi promjer plodnice u trenutku oplodnje kod svih sorata varirao je od 1,5 do 2 mm, ovisno o samom cvijetu i o sorti. Preliminarno je utvrđeno da je trenutak oplodnje tri dana nakon otvaranja cvijeta kada je promjer plodnice 1,5 mm. To je u skladu s literaturnim podacima u kojima je definiran u trenutku kada su njuškica tučka i antere promjene boju (May, 2004).

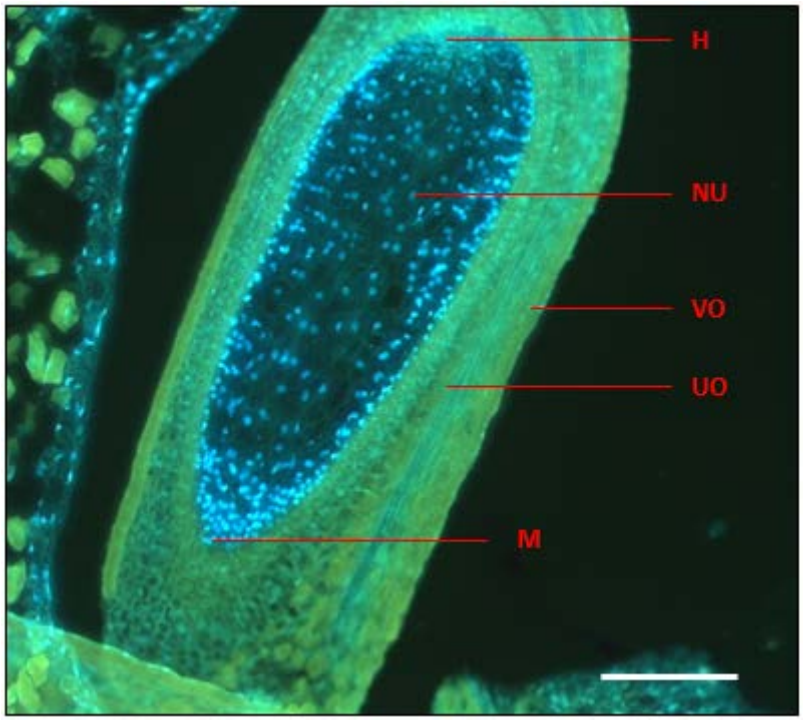
Usporedbom građe cvijeta između sorata vidljivu razliku predstavljao je oblik plodnica koji je kod sorte Chardonnay okrugao i glatkih vanjskih površina, dok kod sorte Grk poprima oblik dvostruke piramide s istaknutim središnjim dijelom (Slika 6). Promjer plodnica u najširem dijelu iznosio je u sorte Grk u stadijima od 1 do 5 dana nakon polinacije (DNP) 2 do 2,5 mm, što je uvijek bilo 0,5 mm više nego u odgovarajućem stadiju sorte Chardonnay.



Slika 6. Stadiji razvoja plodnica sorata Grk i Chardonnay (Ch) u prva tri dana (1-3) nakon otvaranja cvijeta.

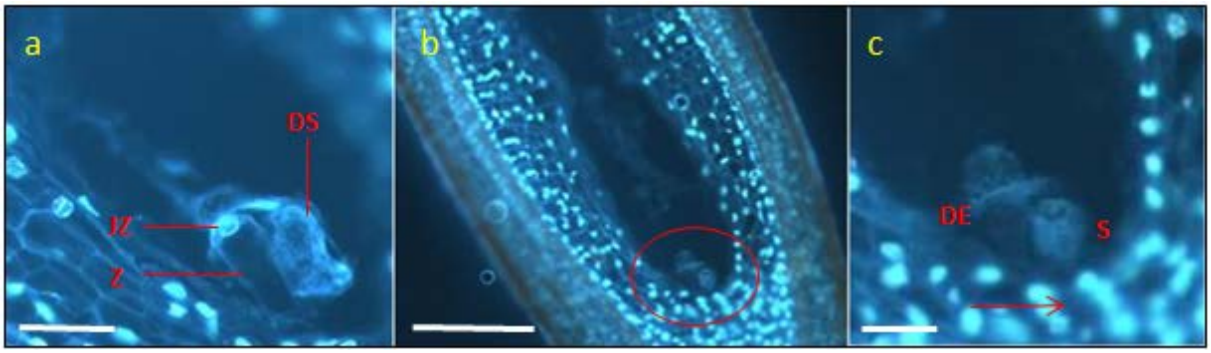
5.1.1 Građa sjemenog zametka i ženskog gametofita sorata Chardonnay, Plavac mali i Grk

Mikroskopiranjem presjeka sjemenih zametaka sorte Chardonnay utvrđen je pravilan izgled sjemenog zametka u fazi početka cvatnje kod širine plodnice od 1,5 mm odnosno danima 1-3 nakon otvaranja cvijeta (Slika 7) veličina sjemenog zametka u tom razvojnom stadiju bila je 100-120 µm. Na uzdužnom presjeku uočavaju se ovojni listovi (integumenti) sjemenog zametka kao i pravilno razvijeno tkivo nucelusa. Na mikropilarnom dijelu nalazi se gusto, višeslojno staničje po čemu se može zaključiti da ovakav izduženi sjemeni zametak još nije oplođen, no izdužen oblik sjemenog zametka ukazuje na njegovu zrelost za oplodnju.



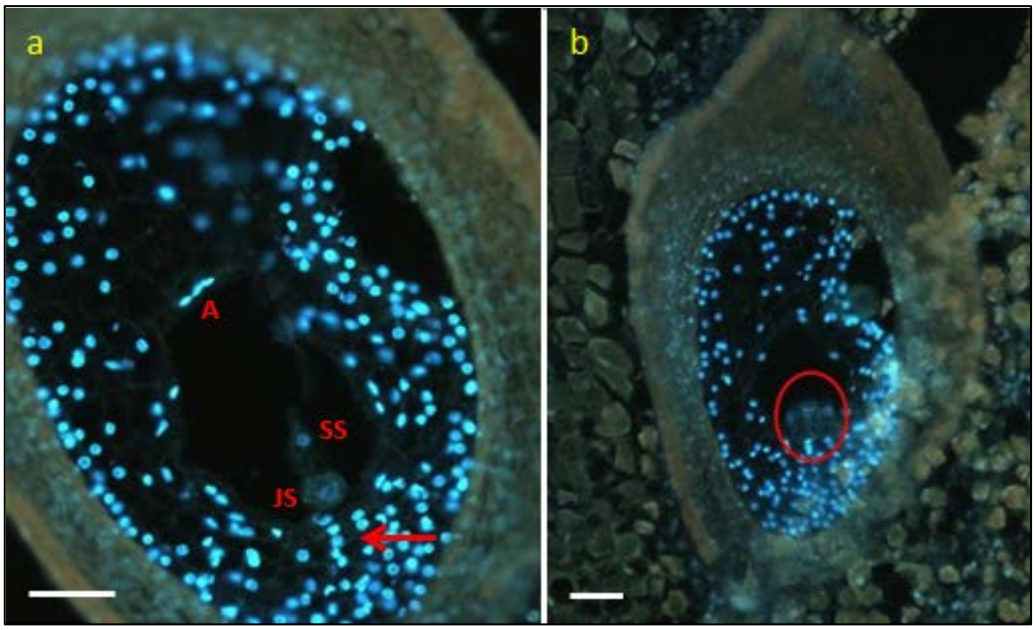
Slika 7. Sjemeni zametak sorte Chardonnay, jedan dan nakon otvaranja cvijeta. Jezgre su bojane bojom DAPI Na slici se jasno uočavaju osnovni dijelovi u građi sjemenog zametka: nucelus (N), vanjski ovojni list (VO), unutarnji ovojni list (UO), halazalni pol (H) te mikropilarni pol (M) (20x). Linija mjerila: 50 µm

U fazi nakon oplodnje na mikropilarnom dijelu bila je vidljiva izdužena zigota s jezgrom lociranom na apikalnom polu, jezgra središnje stanice, te degenerirana sinergida, kroz koju je došlo do prodora peludne mješinice i oslobađanja muških gameta u blizinu jajne stanice i središnje stanice (Slika 8a). Nešto kasnije uočen je stadij dvostaničnog embrija, a uz njega ostatke degenerirane sinergidu a bio je vidljiv i kanal kroz staničje kroz koji je došlo do prodiranja peludne mješinice (Slika 8b i 8c).



Slika 8. Ženski gametofit u području mikropile sorte Chardonnay u periodu dan nakon otvaranja cvijeta. Jezgre su bojane bojom DAPI. Na slici ***(a)*** *uočavaju se zigota (Z) sa jezgrom (JZ) i degenerirana sinergida (DS). Na slici* ***(b)*** *vidljivi su dvostanični embrio i stanica sinergida u mikropilarnom području sjemenog zametka. Na slici* ***(c)*** *pod većim povećanjem jasno se razaznaju dvostanični embrio (DE) te sinergida (S). Ispod stanice sinergide uočava se kanal mikropile (strelica). Linije mjerila: (a)20 µm, (b) 50 µm, (c) 10 µm*

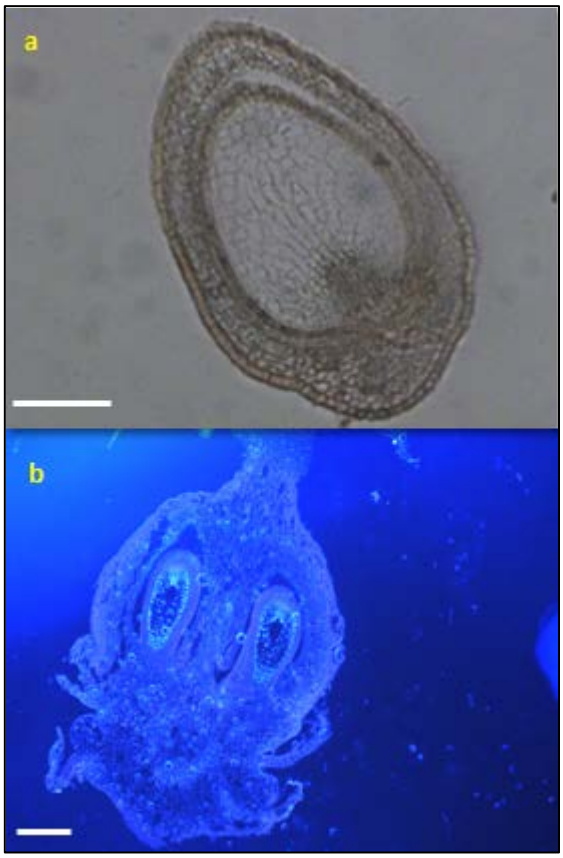
Na presjeku sjemenog zametka sorte Plavac mali jedan dan nakon otvaranja cvijeta uočen je pravilno građeni sjemeni zametak, no njegov je oblik ovalniji od izduženog oblika sjemenog zametka sorte Chardonnay. Širina sjemenog zametka iznosila je u ovom stadiju 120-140 µm. U sjemenom zametku bojanom bojom DAPI bile su jasno uočljive jajna stanica, jezgra središnje stanice, sinergide te stanice antipode (Slika 9a i 9b). Također se uočava kanal u mikropilarnom dijelu kroz koji dolazi do klijanja polenove mješinice. Na Slici 9b se jasno raspoznaje jajni aparat koji se sastoji od dvije bočne sinergide između kojih se nalazi jajna stanica. Ispod jajne stanice uočava se kanal kroz koji je došlo do urastanja peludne mješinice te možemo zaključiti da ova slika prikazuje embrionsku vreću neposredno nakon prodiranja peludne mješinice.



Slika 9: Sjemeni zametak i ženski gametofit sorte Plavac mali jedan dan nakon otvaranja cvijeta. Jezgre su bojane bojom DAPI. Na slici ***(a)*** *se jasno uočavaju dijelovi jajnog aparata: jajna stanica (JS), središnja stanica (SS), stanice antipode* ***(a)****. Sjemeni zametak se nalazi u bobici uzorkovanoj jedan dan nakon otvaranja cvijeta Na slici* ***(b)*** *jasno se uočavaju jajna stanica te dvije bočne stanice sinergide te mikropilarni kanal kroz koji je došlo do klijanja peluda. Slika sjemenog zametka u bobici. Linija mjerila: 20 µm*

Mikroskopskom analizom plodnica sorte Grk (Slika 10) uočen je niz specifičnosti što se tiče građe sjemenog zametka te razvoja embrija nakon oplodnje.

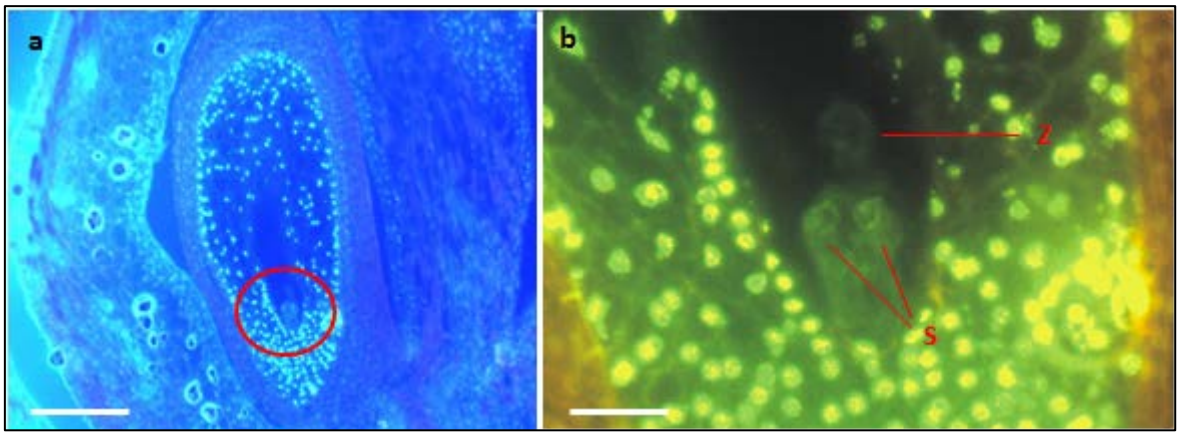
Analizom normalno razvijenih sjemenih zametaka utvrđeno je da su sjemeni zametci u cvjetovima netom prije otvaranja (širina plodnice 2 mm) ovalnog oblika (Slika 10a) slično onom u sorte Plavac, dok se u zrelosti izdužuju (Slika 10b). U stadiju zrelom za oplodnju širina sjemenog zametka iznosila je 100-120 µm.



Slika 10. Sjemeni zametak sorte Grk. ***(a)*** *u periodu neposredno pred otvaranje cvijeta sa karakterističnim ovalnim oblikom. Jezgre su bojane bojom DAPI. Slika* ***(b)*** *predstavlja presjek plodnice bobice koja je uvrštena u kategoriju kao male besjemene bobice (pasoline). Linija povećanja: (a) 25 µm, (b)100 µm.*

Analizom plodnica sorte Grk uočio sam postojanje plodnica čija je širina dosezala ili prelazila promjer od 2 mm, ali koje su tijekom pune cvatnje i dalje bile pokrivene cvjetnom kapicom. Kako prisutnost cvjetne kapice sugerira nemogućnost oprašivanja i oplodnje ovakve sam plodnice definirao kao potencijalno besjeme bobica u grozdu. Njihovi su sjemeni zametci bili izduženi ukazujući na njihov pravilan proces razvitka (Slika 11a).

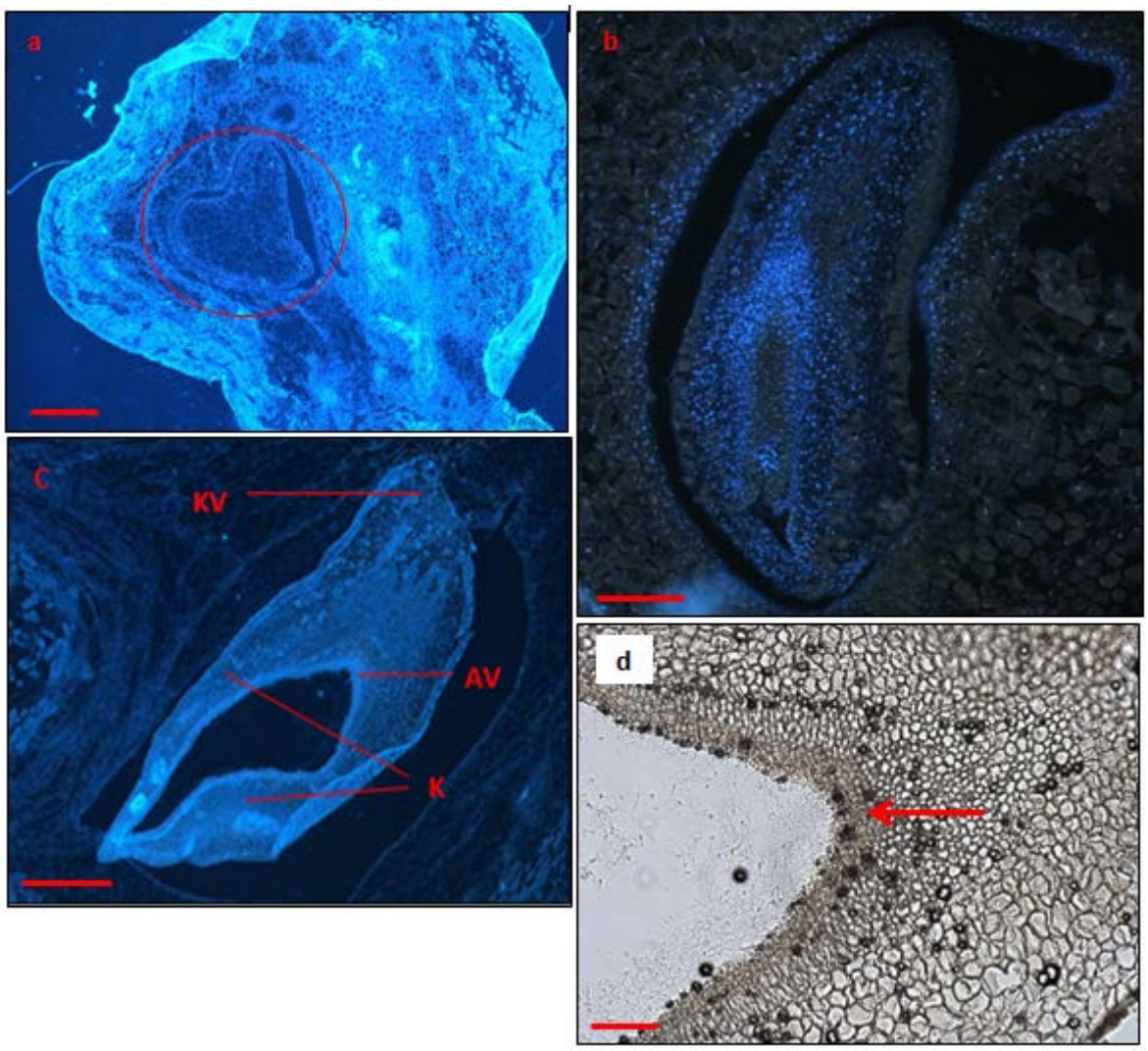
Unatoč pretpostavke o neodvijanju oplodnje analiza sjemenih zametaka ovakovih bobica ukazuje na pravilnost razvitka jajnog aparata i početak embriogenog razvitka. Unutar embrionske vreće u vremenu zrelosti za oplodnju utvrđeno je postojanje zigote u fazi intenzivnog izduživanja (Slika 11a). Također je očito da obje sinergide izgledaju jednako i nedegenerirano (Slika 11b), ukazujući da nije došlo do prodora peludne mješinice i pravilne oplodnje (Slika 8a).



Slika 11. Sjemeni zametak plodnice s kaliptrom sorte Grk. Na slici ***(a)*** *jezgre su bojane bojom DAPI a unutar sjemenog zametka uočavaju se stanice sinergide i izdužena zigota (povećanje objektiva 20x). Pod povećanje objektiva 40x* ***(b)*** *jasno se razaznaju dvije sinergide (S) te izdužena zigota (Z). Linija povećanja: (a) 40 µm, (b) 10 µm.*

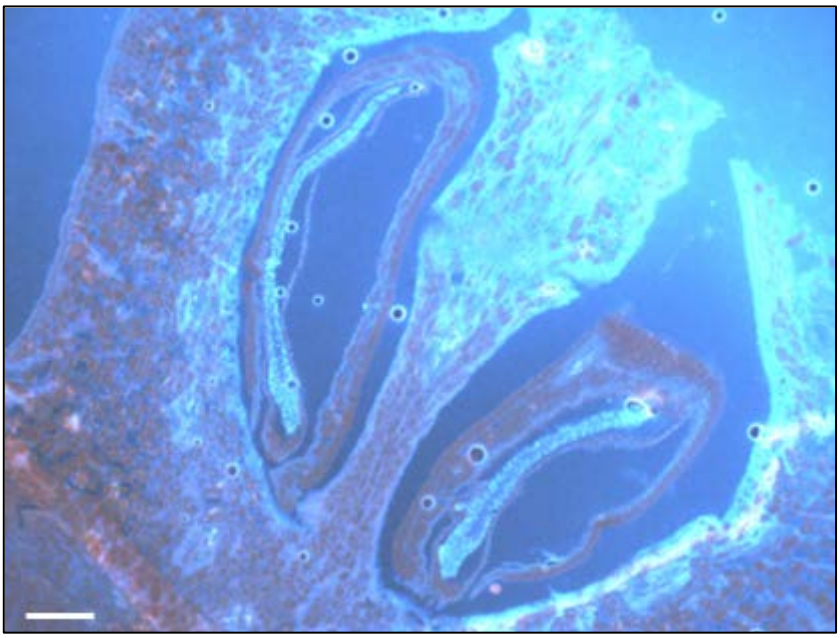
5.2 Razvitak embrija sorte Grk

Kod sjemenih bobica sorte Grk utvrđeni su pravilni stadiji embrijskog razvitka. Sjemene bobice veličine 3 mm unutar sjemenog zametka sadržavale su srcoliki stadij embrija (Slika 12a) dok je kod bobica veličine 5 mm utvrđen torpedni ili kotiledonarni stadij razvitka embrija (Slika 12b i 12c). Kod oba stadija utvrđena je i diferencijacija meristemskog tkiva apikalnog vrška (Slika 12d).



Slika 12. Faze embrionalnog razvitka unutar sjemenih zametaka oplođenih bobica sorte Grk. Srcoliki stadij embrija ***(a)*** *(5x, DAPI) te embrio u fazi torpeda u bobicama veičine 5mm* ***(b)*** *(20x, DAPI). Na kotiledonarnom stadiju embrija* ***(c)*** *jasno se uočava korjenski dio (KV), apikalni dio (AV) te kotiledoni (K) (5x, DAPI). Na apikalnom dijelu embrija* ***(d)*** *uočavaju se slojevi stanica vršnog meristema (strelica) (20x, DAPI). Linija mjerila: (a) i (c) 20 µm i (b)10 µm, (d) 5 µm*

Suprotno normalnom odvijanju embriogeneze kod sorata Plavac mali i Chardonnay u 78 % analiziranih plodnica sorte Grk uočena je degeneracija sjemenih zametaka neposredno po dosezanju zrelosti za oplodnju (rano propadanje) ili kasnije u bobica veličine 5 mm (Slika 13), što je uzrokovalo abortiranje cijelog sjemenog zametka i/ili embrija. U sorte Grk embriji su se razvijali do stadija torpeda ili kotiledonarnog prikazanog na slici 12. u samo 22 % analiziranih plodnica, dok je u svim ostalima došlo do propadanja svih sjemenih zametaka ili embrija.

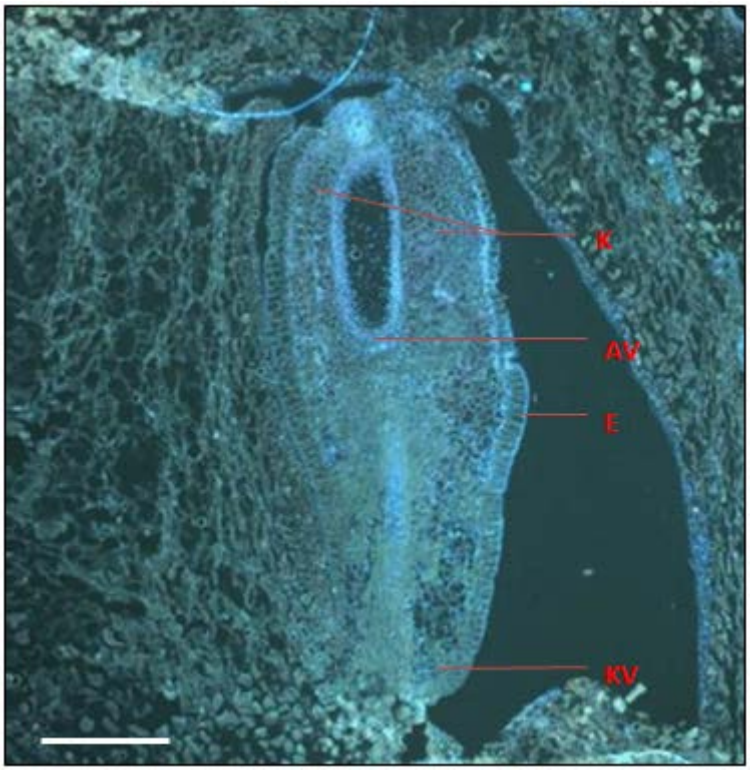


Slika 13. Degenerirani sjemeni zametak bobica promjera 5 mm. Obojeno DAPI bojom. Ovi primjeri degeneracije sjemenog zametka započeli su u fazama u kojima sjemene bobice sadrže topredni stadij embrija. (5x) Linija mjerila: 200 µm.

5.3 Razvitak embrija sorata Chardonnay i Plavac mali

U gotovo svim analiziranim plodnicama sorte Chardonnay analizom sjemenih zametaka utvrđen je normalan tijek embriogeneze sa uznapredovalim razvojnim stadijima embrija. Kako u kotiledonarnom stadiju embrij ima ustanovljena sva središta postembrijskog razvitka (primarne meristeme), pravilno razvijeni kotiledonarni embriji unutar sjemenog zametka bili su kriterij normalnog tijeka embriogeneze.

Na slici 14. prikazan je normalno razvijen embrij u razvojnom stadiju torpeda sorte Plavac mali unutar prereza plodnice promjera 5 mm. Na embriju su jasno uočljivi kotiledoni, korijenski dio, vanjska epiderma, provodni sustav te zone sitnih stanica koje tvore vršne meristeme iz kojih će se nakon faze sazrijevanja embrija nastaviti postembrijski razvitak.



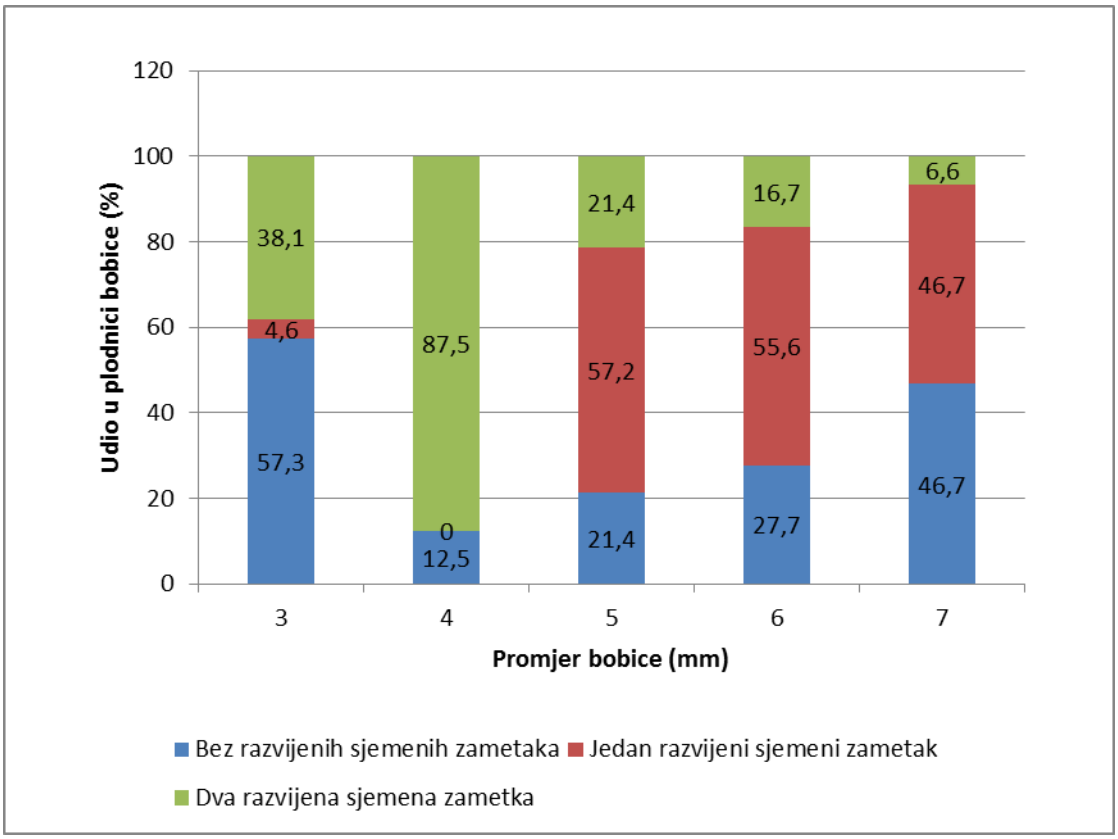
*Slika 14: Embrio torpednog razvojnog stadija sorte Plavac mali razvijen unutar bobice promjera 5 mm. Na slici su jasno uočljivi dijelovi embrija: kotiledoni **(K)**, staničje budućeg korijenovog meristema **(KV)**, staničje budućeg apikalnog meristema **(AV)**, epiderma **(E)** (5x; DAPI)**.** Linija mjerila: 100 µm*

5.4 Analiza broja sjemenih zametaka kod sorta Grk, Plavac mali i Chardonnay

Analizom broja sjemenih zametaka u razvijajućim plodnicama sorata Grk, Plavac mali i Chardonnay utvrdio sam da od 1-3 dana nakon oplodnje (promjer plodnica ovisno o sorti iznosi 1,5-2,5 mm) 28,6 % plodnica sorte Grk sadrži više od 4 sjemena zametka, 5 ili najčešće 6. Kod sorte Plavac mali čak je 47,4 % plodnica sadržavalo 5 ili 6 sjemenih zametaka, dok je kod sorte Chardonnay 100 % analiziranih plodnica sadržavalo 4 sjemena zametka. Tijekom prva tri dana nakon oplodnje događa se intenzivno propadanje sjemenih zametaka tako da već u plodnicama od 3 mm nalazimo najviše 2 vijabilna sjemena zametka u sorata Grk i Plavac mali odnosno tri u sorte Chardonnay.

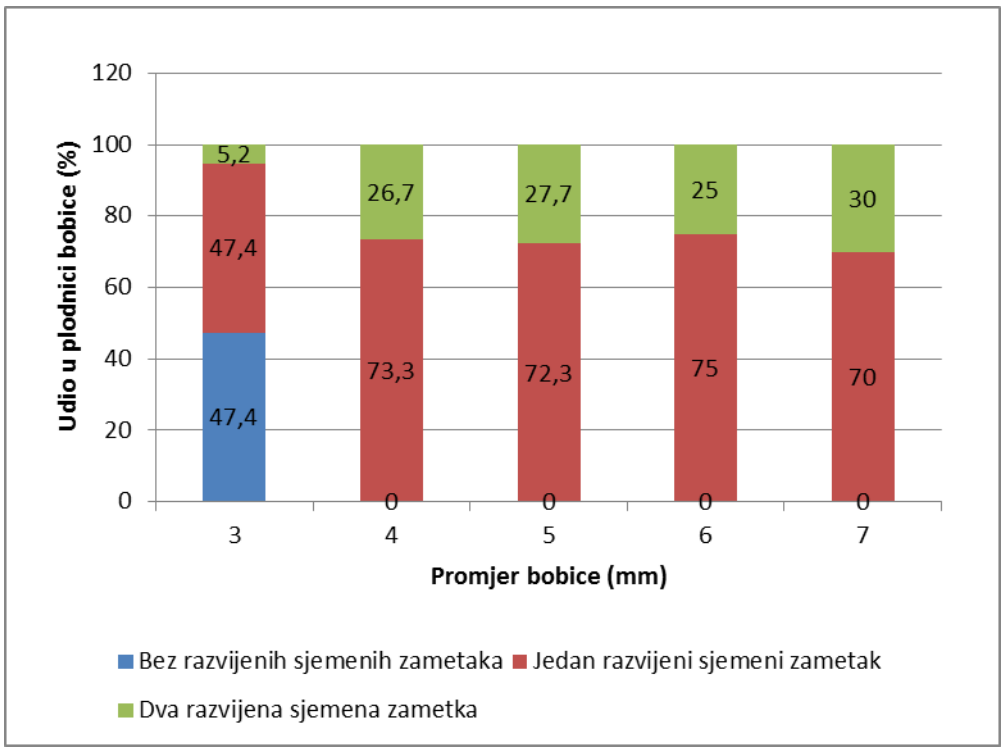
Ustanovljen je i ukupni broj sjemenih zametaka te broj razvijenih i nerazvijenih sjemenih zametaka u plodnicama promjera 3-7 mm. U stadiju razvitka tri dana nakon pune cvatnje prvi puta su uočene razlike između sjemenih zametaka iste plodnice, onih koji su nastavljali razvitak te sjemenih zametaka koji su poceli stagnirati u razvitku i propadali.

Analizom broja sjemenih zametaka kod bobica većih dimenzija dokazano je da kod sorte Grk plodnice od 4 mm sadrže najčešće dva razvijajuća sjemena zametka no već u plodnicama od 5 mm najveći broj sadrži samo jedan razvijajući sjemeni zametak. U plodnicama od 7 mm broj sjemenih zametaka iznosi ili jedan ili ih uopće nema, što pokazuje na visoku stopu abortivnosti sjemenih zametaka sorte Grk (Graf 7). Općenito, intenzivno propadanje sjemenih zametaka u sorte Grk počinjalo je u stadiju u kojem bobice imaju između 4 i 5 mm u promjeru i nastavljalo se sve do kasnijih faza razvitka u kojem nastaju bobice od 7 mm koje su odgovarale zrelim stadijima embriogeneze (torpedo, kotiledonarni). Ovo je ujedno glavna razlika ove sorte u odnosu na sorte Plavac mali i Chardonnay. Rezultat ukazuje da propadanje sjemenih zametaka u sorte Grk nije bilo isključivo povezano s događajem oplodnje, odnosno ne oplođivanje sjemenog zametka zbog čega on propada u ranijim fazama, već da može korelirati i s kasnijim stadijima razvitka u kojim očekujemo srcolikoi, torpedni ili kotiledonarni stadij razvitka embrija.

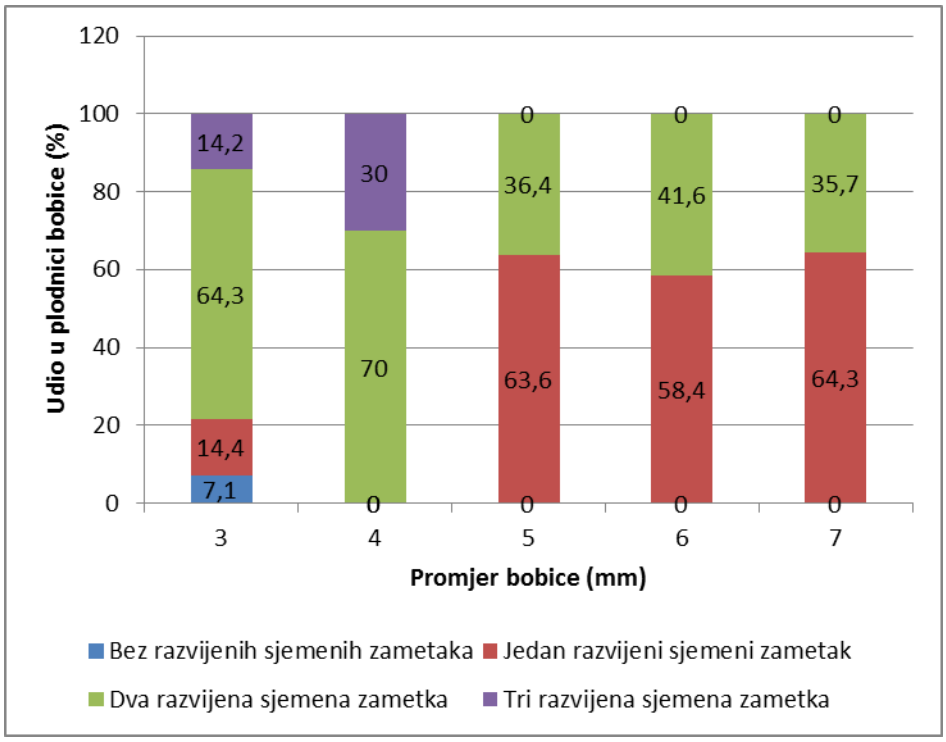


Graf 7. Udio sjemenih zametaka u bobicama sorte Grk pri veličinama bobica od 3-7 milimetara. Vidljivo je da bobice promjera 4 mm sadrže uglavnom dva razvijajuća sjemena zametka dok do faze bobica od 7 mm prevladavaju besjemene ili bobice s jednim sjemenim zametkom.

Kod sorte Plavac mali uočen je također veliki udio abortiranih sjemenih zametaka u fazi kada plodnice dosežu promjer od 7 mm, 30 % njih sadržavao je dva a 70 % po jedan sjemeni zametak. U ove sorte sve bobice sadržavale su jedan ili dva sjemena zametka a se njihov se broj ustaljivao već u fazi promjera bobice od 4 mm. Stoga nije bio uočen nestanak sjemenih zametaka u kasnijim stadijima kao ni plodnice od 7 mm bez sjemenih zametaka (Graf 8). U sorte Chardonnay u nekim plodnicama nastavlja se razvijati i po tri sjemena zametka koje nestaju nakon faze razvitka bobica od 4 mm, tako da je u plodnicama većima od 5 mm razvitak uglavnom nastavljao jedan ili dva sjemena zametka (Slika 9).

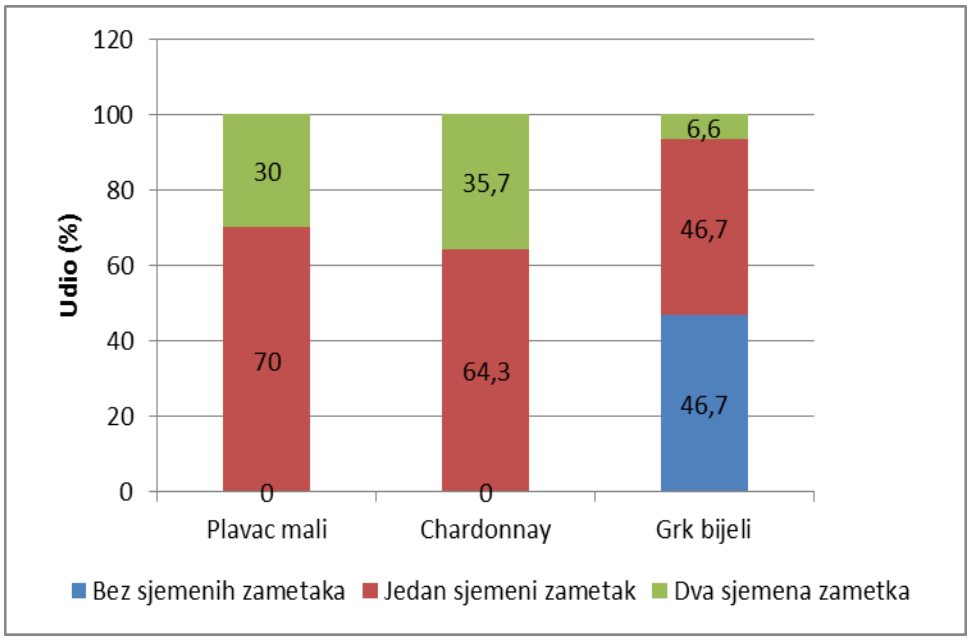


Graf 8. Udio sjemenih zametaka u bobicama sorte Plavac mali pri veličinama bobica od 3-7 milimetara. Vidljivo je da bobice promjera 4 mm sadrže uglavnom jedan razvijajući sjemeni zametka te da u kasnijim fazama razvoja nije dolazilo do propadanja sjemenih zametaka.



Graf 9. Udio sjemenih zametaka u bobicama sorte Chardonnay pri veličinama bobica od 3-7 milimetara. Vidljivo je da bobice promjera 4 mm sadrže uglavnom dva razvijajuća sjemena zametka, no značajan udio bobica ima i tri sjemena zametka. Nakon faze u kojoj bobice premaše promjer od 4 mm više ne dolazi do propadanja sjemenih zametaka.

Zaključno, u bobicama koje su dosegle veličinu promjera 7 mm kod sorte Plavac mali nailazimo na 1 (70 %) ili dva (30 %) razvijajuća sjemena zametka. U istoj fazi rasta kod sorte Chardonnay nailazimo na 64,3 % bobica s 1 sjemenim zametkom, 35,7 % onih sa dva. Kod sorte Grk u 46,70 % plodnica abortirani su svi sjemeni zametci, dok u isto toliko svoj razvitak nastavlja jedan sjemeni zametak. Samo u 6,6 % bobica razvijaju se po dva sjemena zametka (Graf 10).



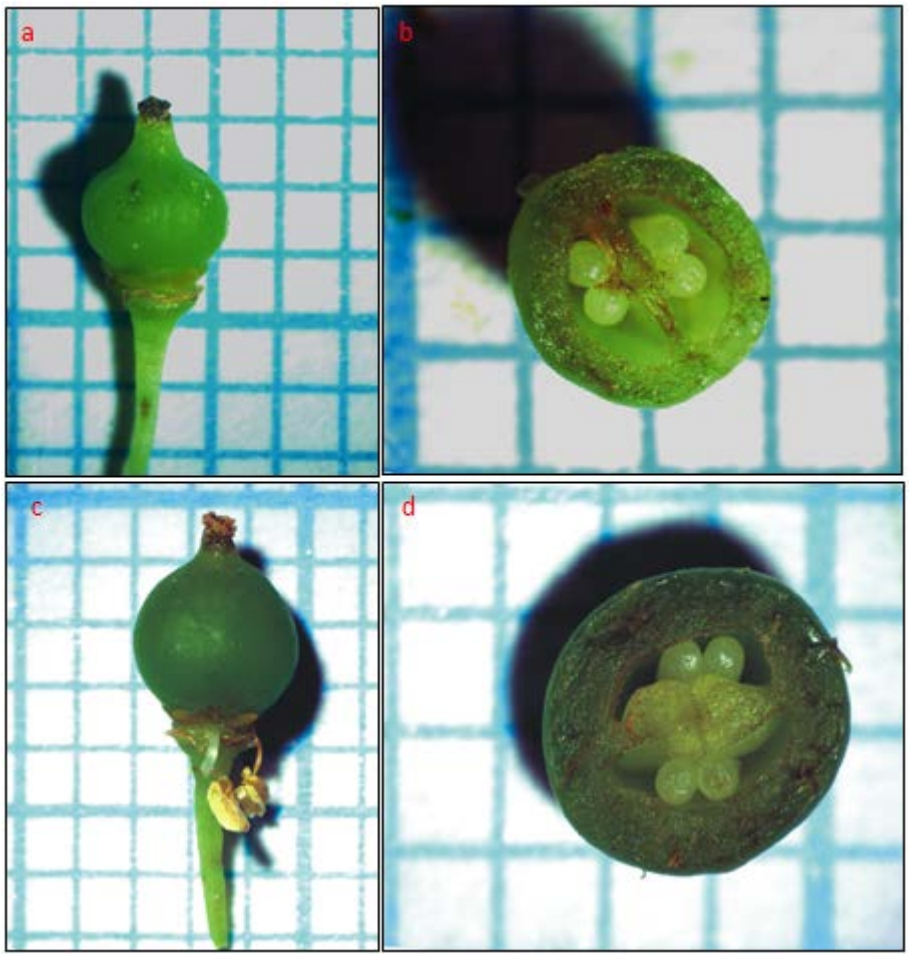
Graf 10. Udio bobica veličine 7 milimetara sa određenim brojem sjemenih zametaka.

Razlog visoke abortivnosti sjemenih zametaka sorte Grk koja u konačnici dovodi do učestale pojave besjemenih bobica povezan je i s opaženom degeneracijom sjemenih zametaka u kasnijim fazama razvitka.

5.5 Razvitak bobica i sjemenih zametaka sorte Grk nakon kontrolirane oplodnje

Bobice sa grozdova koji su bili u izolaciji tijekom cvatnje sa ciljem indukcije razvoja pasolina pet dana nakon procijenjene zrelosti za oplodnju imale su prosječan promjer od 2.6 mm a u svima je utvrđeno postojanje četiri sjemena zametaka (Slike 15a i 15b). Ovaj udio ne podudara se s udjelom sjemenih zametaka u bobica iste veličine kod kojih oplodnja nije bila kontrolirana. Razlika proizlazi iz činjenice da oplođeni sjemeni zametci unutar iste bobice inhibiraju razvitak neoplođenih te ovi, kako je pokazano propadaju ubrzo nakon dosezanja zrelosti za oplodnju. U slučaju spriječene oplodnje nema inhibicije razvitka neoplođenih sjemenih zametaka od strane oplođenog (ih).

Kod sjemenih bobica koje su uzorkovane sa grozdova sorte Grk inducirano oprašenih peludom sorte Chardonnay uočene su, nakon završetka cvatnje, bobice normalnoga okrugloga oblika bez izraženo izduženog vrata tučka. Takve bobice pet dana nakon oplodnje imale su nešto veći promjer od pasolina, u proskjeku 3,2 mm (Slike 15c i 15d.). Također kod ovakvog tipa bobica pronađene su i bobice koje sadrže šest sjemenih zametaka (Slika 16).

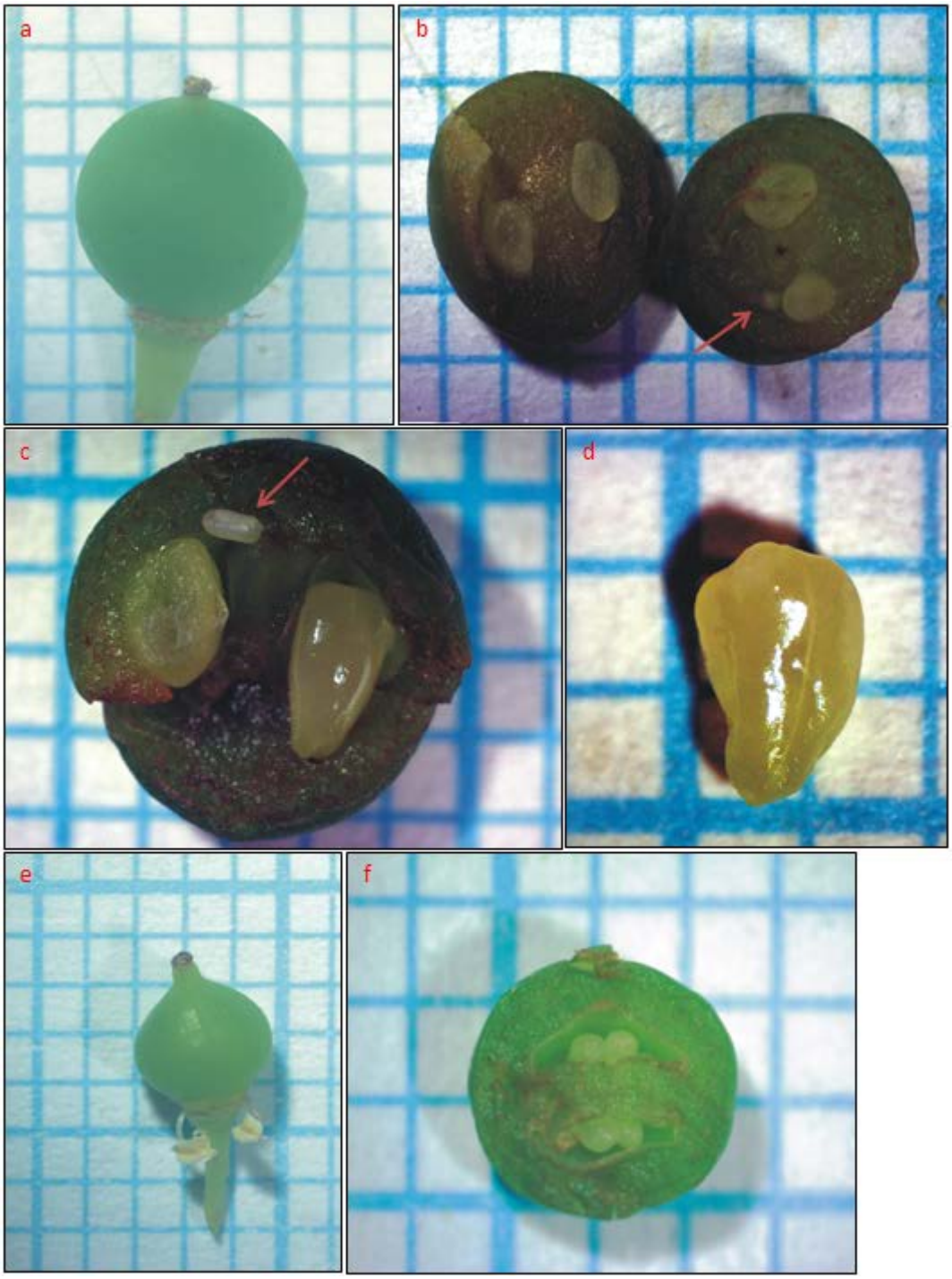


Slika 15. Besjemena bobica (pasolina) pet dana nakon zrelosti za oplodnju. ***(a)*** *Bobice sa izoliranih grozdova. Na bobici se uočava karakteristično prošireni središnji dio sa suženim vratom prema njuškici tučka. Veličina bobice je 2.13 mm (0,8x).* ***(b)*** *Poprečni presjek besjemene bobice (pasoline). Vide se četiri jednako razvijena sjemena zametka (1,6x).* ***(c)*** *Morfologija bobica oplođenih peludi sorte Chardonnay (sjemene bobice). Uočava se pravilni okrugli oblik bobice bez izražene izdužene njuškice tučka. Promjer bobice je 2,85 mm (0,8x).* ***(d)*** *Horizontalni presjek kroz plodnicu sjemene bobice pri čemu se uočavaju četiri podjednako razvijena sjemena zametka.*



Slika 16. Poprečni presjek sjemene bobice sorte Grk oplođene polenom sorte Chardonnay promjera 2,7 mm unutar čije plodnice se nalazi 6 sjemenih zametaka.

Osam dana nakon oplodnje kod grozdova na kojima je provedeno inducirano oprašivanje uočene su unutar plodnica značajne razlike u broju i razvoju sjemenih zametaka. U plodnicama je utvrđena prisutnost jednoga ili dva razvijenih sjemenih zametaka dok su ostali bili zakržljali. Oplodnja je i ovom slučaju okidač propadanja seta sjemenih zametaka. Prosječna veličina bobice sa dva sjemena zametka bila 3,8 mm a sa jednim sjemenim zametkom 3,6 mm. Na slici 17a-c prikazane su bobice kod kojih se jasno uočavaju razvijeni i zakržljali sjemeni zametci. Razvijeni sjemeni zametci dužine su prosječno 2 mm i širine 0,8 mm. Kod bobica koje su okarakterizirane kao neoplođene (pasoline) deset dana nakon oplodnje dolazi do povećanja volumena mesa bobice dok sjemeni zametci ostaju jednake veličine kao i u ranijim fazama (Slika 17e i 17f). Deset dana nakon pune cvatnje uočavaju se razlike na grozdovima sa izoliranih cvati koje sadrže samo pasoline i sa grozdova koji su inducirano oprašeni (Slika 18).

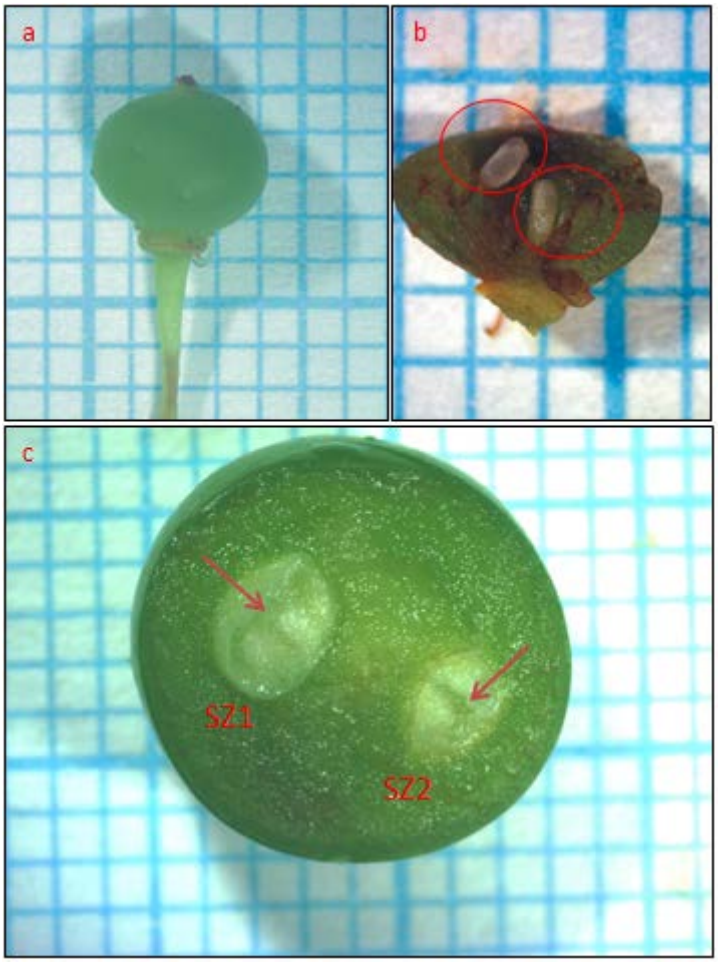


Slika 17. Sjemene bobice osam dana nakon oplodnje. ***(a)*** *Sjemena (oplođena) bobica promjera 4.2 mm osam dana nakon oplodnje (0,8x).* ***(b)*** *Na horizontalnom presjeku bobice uočavaju se dva pravilno razvijena sjemena zametka te jedan zakržljali (strelica) (1x).* ***(c)*** *Horizontalni presjek sjemene bobice kod koje se uočava jasna razlika između razvijenog i zakržljalog (strelica) sjemenog zametka. Promjer bobice je 5 mm (1,25x).* ***(d)*** *Sjemeni zametak u sjemenoj bobici promjera 4.33 mm (1,6x).* ***(e)*** *Pasoline veličine 3 mm osam dana od pune cvatnje* ***(f)*** *u kojima je na poprečnom presjeku utvrđeno da sadrže četitiri nerazvijena sjemena zametka (1,6x).*



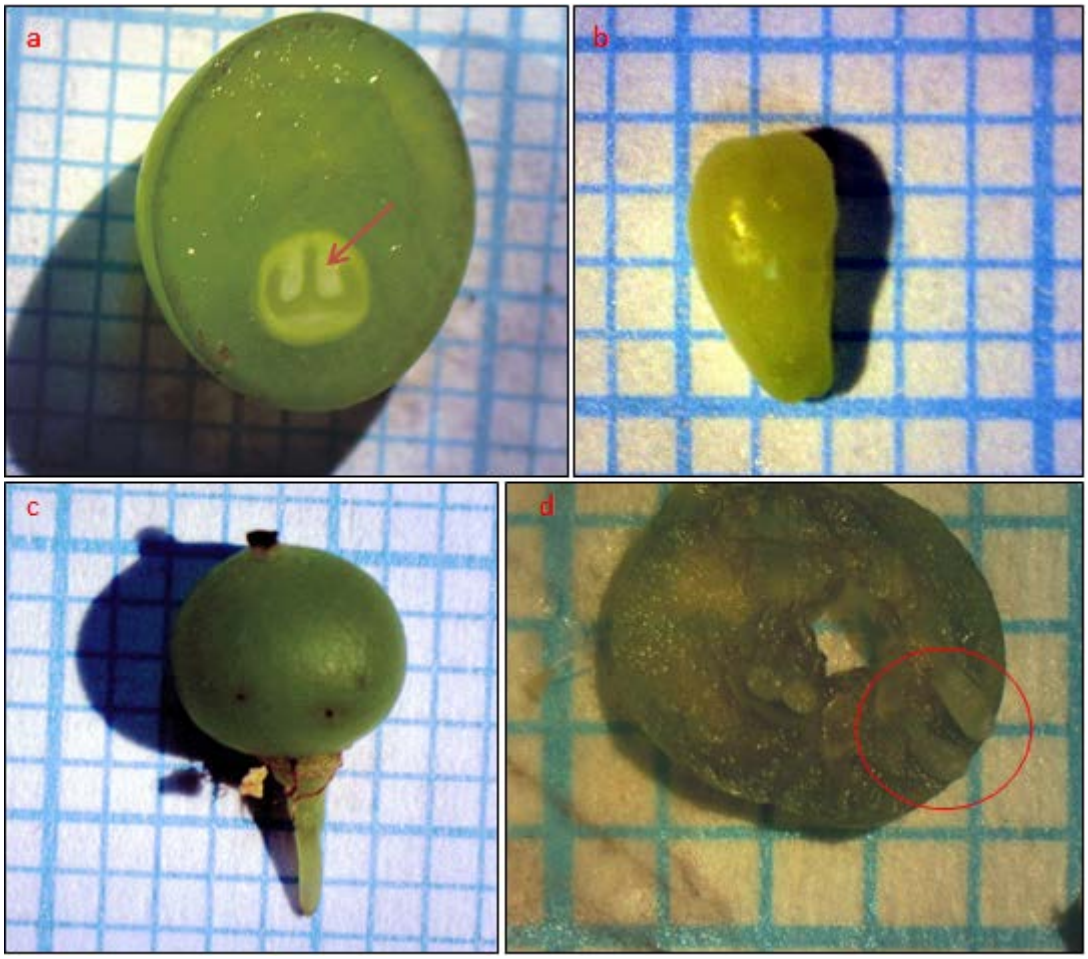
Slika 18. Razlike u veličini bobica kod grozdova deset dana nakon oplodnje. Grozd koji je u vrijeme pune cvatnje bio u izolaciji (desno) te grozda kod kojeg je provedeno inducirano oprašivenje polenom sorte Chardonnay (lijevo). Na lijevom grozdu su sjemene bobice a na desnom pasoline. Promjer bobica u izoliranim grozdovima kretao se između 2.5-3 mm a kod grozdova sa induciranom oplodnjom 4.5- 5.5 mm.

Kod grozdova petnaest dana nakon pune cvatnje uočena je jasna razlika između oplođenih bobica i pasolina(Slika 19a-c). Primarna razlika bila je u veličini odnosno promjeru bobice pri čemu je prosječan promjer sjemene bobice bio 7,6 mm a pasoline 3,6 mm. Na poprečnom prerezu bobice utvrđene su i razlike u građi sjemenoga zametka. Kod pasolina sjemeni zametci su nerazvijeni, veličine do jedan milimetar dok su kod velikih bobica sjemeni zametci u potpunosti razvijeni duzine 4 mm i širine 2,5 mm. Na presjeku sjemenke utvrđeno je i pravilno formirano tkivo embrija.



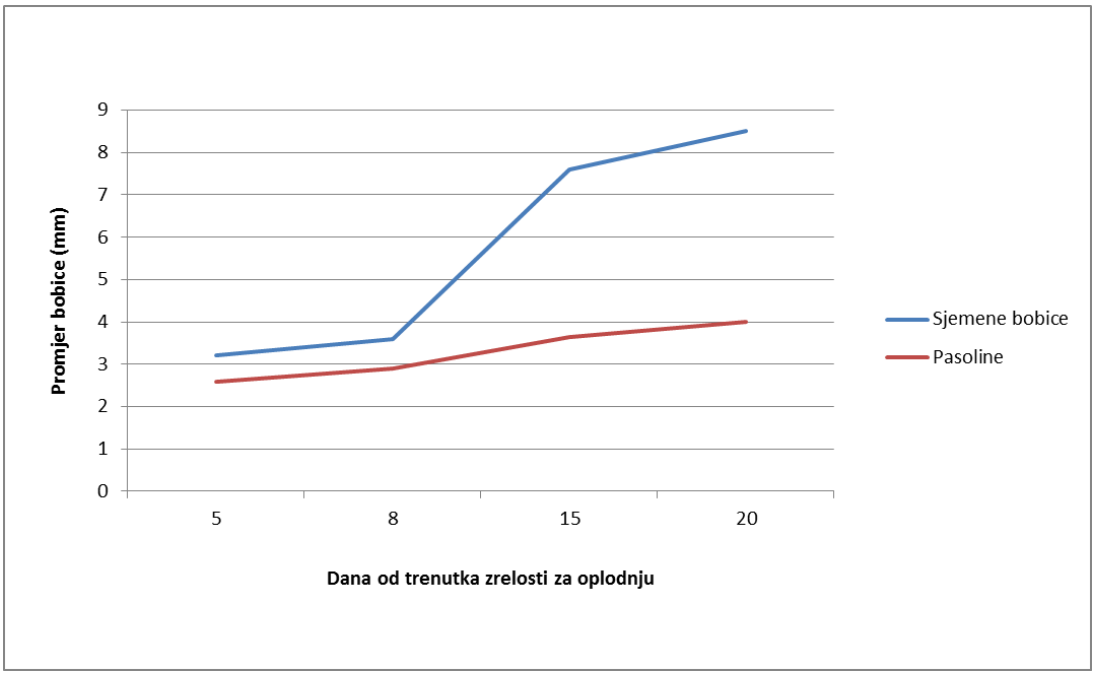
Slika 19. Pasolina u periodu 15 dana nakon otvaranja cvijeta. ***(a)*** *Promjera 4,36 mm (0,65x).* ***(b)*** *Sekcijom bobice utvrđeno je postojanje četiri zakržljala sjemena zametka veličine 1 mm (1,65x).* ***(c)****. Sjemena bobica promjera 9 mm. U mesu bobice uočavaju se jedan razvijeni sjemeni zametak (SZ1) te jedan manji koji zaostaje u rastu (SZ2). Na presjeku kroz oba sjemena zametka uočavaju se u obliku zelene krivulje razvijeni embriji (crvena strelica). (0,65x).*

Dvadeset dana nakon oplodnje sjemene bobice su bile prosječnoga promjera 8.5 mm dok su pasoline prosječnoga promjera 4 mm. Na presjeku sjemenih bobica utvrđena je kod svih bobica prisutnost jednoga razvijenog sjemenog zametka (Slika 20a i 20b.). U ovoj fazi na presjeku sjemenog zametka utvrđena je prisutnost razvijenoga embrija. Kod pasolina je utvrđeno postojanje četiri nerazvijena sjemena zametka (Slika 20c i 20d).



Slika 20. Sjemene bobice i pasoline u fazi rasta. ***(a)*** *Kod sjemene bobice veličine 8,5 mm uočava se prisutnost jednog razvijenog sjemenog zametka. Na poprečnom presjeku sjemenog zametka jasno se raspoznaje tkivo embrija (strelica). (0,65x)* ***(b)****. Razvijeni sjemeni zametak kod bobice širine 8 mm dužine je otprilike 4 mm i širine 2 mm (1,2).* ***(c)*** *Pasolina promjera 4,2 mm (0,67x).* ***(d)*** *Na horizontalnom presjeku pri bazi bobice u ovoj fazi razvoja uočava se prisutnost malih nerazvijenih sjemenih zametaka (1,2x).*

Analizom promjera bobica u pojedinim fazama razvoja kao i sadržaja sjemenih zametaka u pojedinim periodima utvrđena je i dinamika razvoja bobica i pasolina. (Graf 11). Rezultat pokazuje da pasoline dosežu prosječan promjer od 4 mm za razliku od oplođenih bobioca čije je prosječan promjer u istom ternutku u odnosu na zrelost za oplodnju bio oko 8,5 mm. Ograničen razvitak usploda kod pasolina uvjetovan je drugim čimbenicima a ne oplodnjom. Zbog izostanka oplodnje ujednačeno su se do određenog stadija razvijali svi sjemeni zametci, nakon čega su svi propadali.

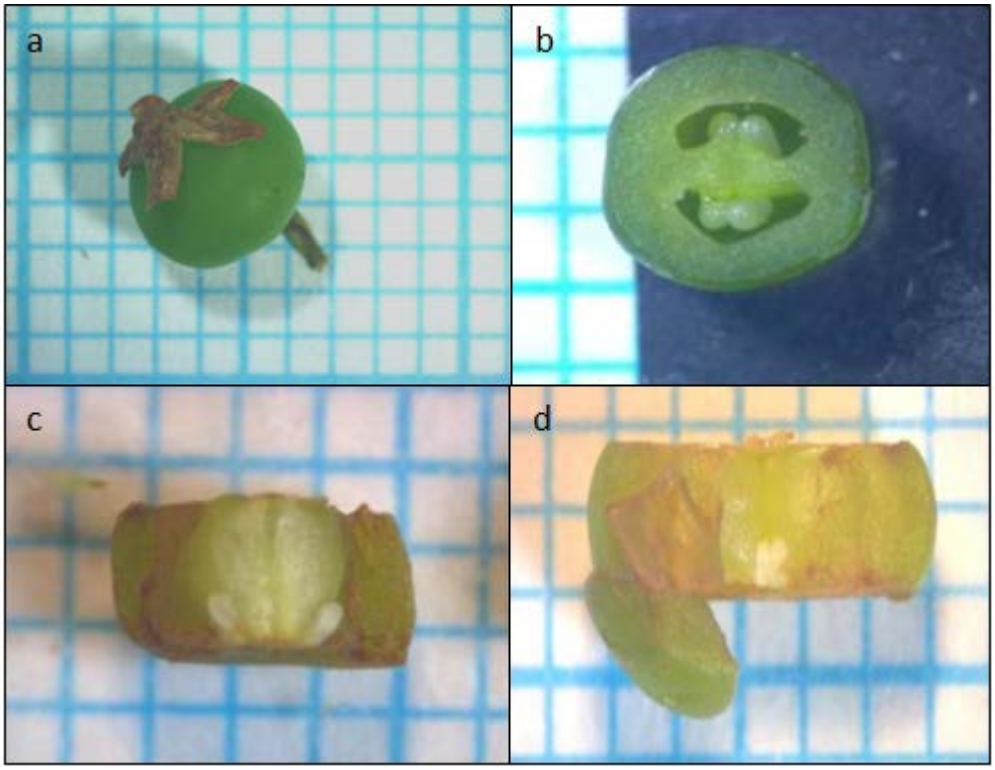


Graf 11. Dinamika rasta sjemenih bobica i pasolina u određenom periodu nakon zrelosti za oplodnju.

Osim veličine kao jednog od osnovnih razlikovnih osobina oplođenih bobica Grka, u periodu pune cvatnje na pojedinim cvatovima možemo uočiti nezanemariv broj plodnica kod kojih je oplodnja spriječena čvrstim prianjanjem cvjetne kape (kaliptre) (Slika 21a i 21b), te smo ove bobice, unatoč njihove izrazite veličine smatrali neoplođenima. Promjer ovakvih plodnica u vrijeme pune cvatnje odgovarao je promjeru plodnica sjemenih bobica 3 – 5 dana nakon oplodnje (Slika 22). Neoplođene plodnice s kaliptrom u fazi pune cvatnje imale su promjer 3 mm, te su nastavljale rasti do 7 mm promjera (što odgovara veličini sjemenih bobica 12-13 dana od trenutka zrelosti za oplodnju- Graf 11) prilikom čega su propadali sjemeni zametci do potpunog nestanaka u plodnicama promjera 7 mm.



Slika 21. ***(a)*** *i* ***(b)*** *Bobice na grozdu kod kojih je uočeno da ne dolazi do opadanja kapice u vrijeme pune cvatnje te im je promjer veći od plodnica otvorenih cvjetova.*

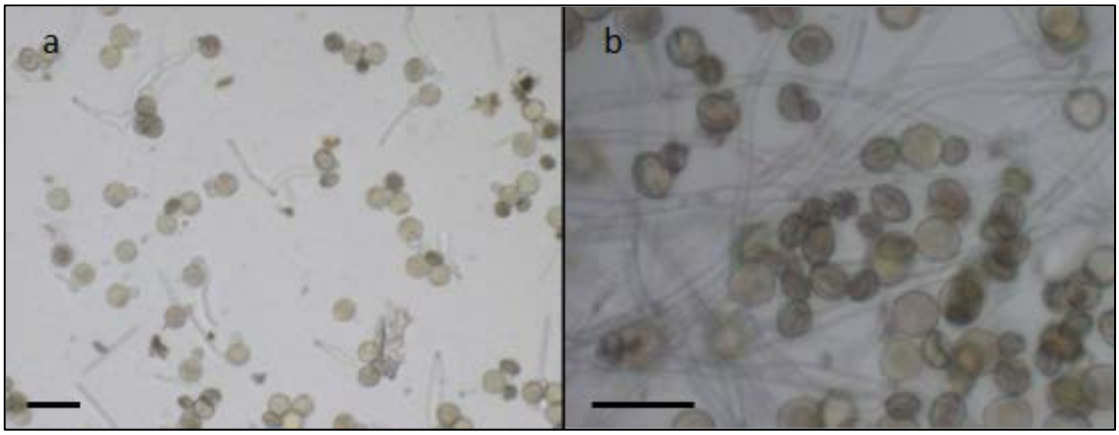


Slika 22. Degeneracija sjemenih zametaka u u bobicama pokrivenim kaliptrom. Plodnice ovakovih bobica ***(a)*** *u fazi pune cvatnje imale su promjer 3 mm, te su nastavljale rasti do 7 mm promjera. Tijekom razvitka plodnica* ***(b)*** *dolazilo je do propadanja sva četiri sjemena zametka* ***(c)****, te do njihovog potpunog nestanka u fazi rasta u kojoj plodnica doseže promjer od 7 mm* ***(d)****.*

5.6 Analiza građe peludi i klijavosti muškog gametofita

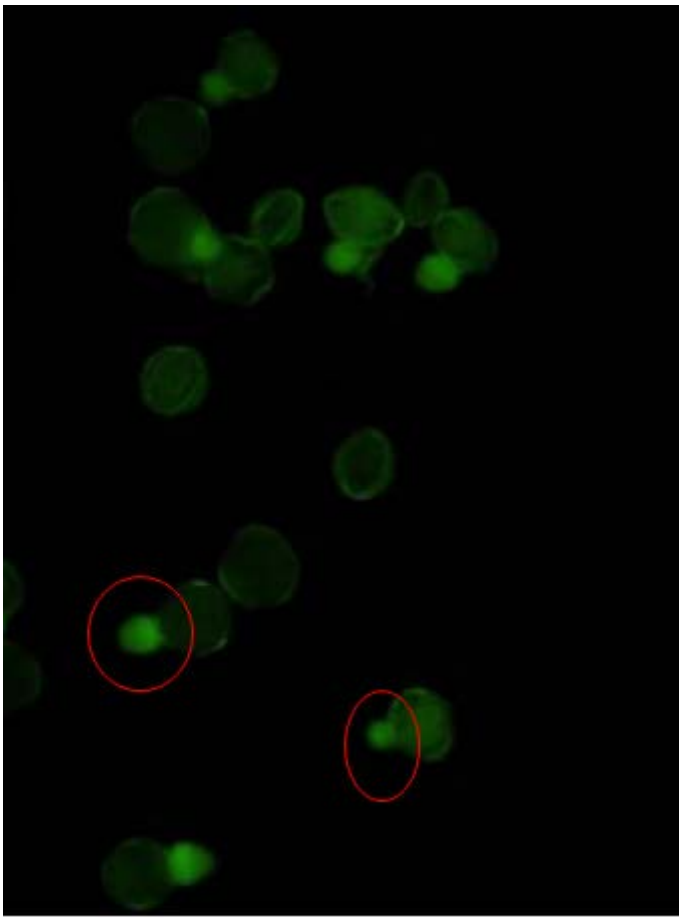
5.6.1 Klijavost peludi sorte Chardonnay *in vitro*

Ispitivanjem klijavosti peludi sorte Chardonnay na podlozi za klijanje bilo je vidljivo da je pelud sorte Chardonnay klijav. Dva sata nakon naklijavanja došlo je do klijanja značajnog broja peludovih zrnaca (Slika 23a). Dvadeset sati nakon naklijavanja klijavost je bila izrazito dobra a rezultat je bila gusta mreža peludovih cijevi na promatranom preparatu (Slika 23b)



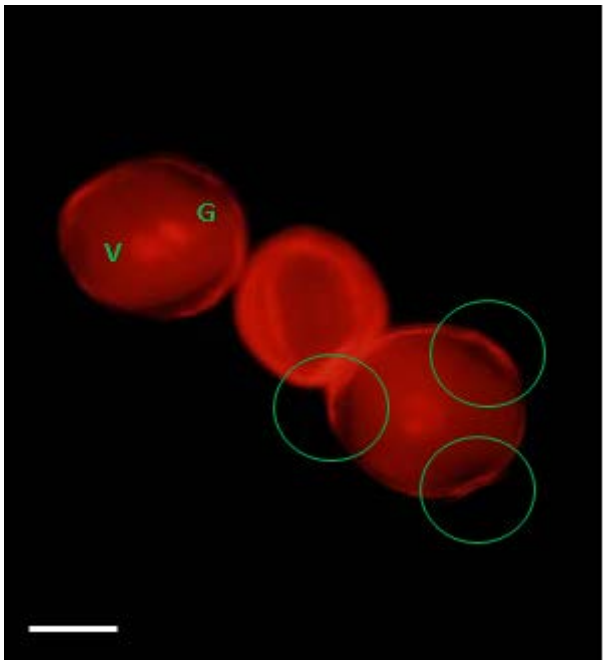
Slika 23. Klijanje peludi sorte Chardonnay in vitro. ***(a)*** *Već nakon dva sata dolazi do klijanja kod određenog broja peludnih zrnaca. Klijavost se uočava kao pojava peludovih cjevčica koje izrastaju iz peludnih zrnaca (povećanje objektiva 5x).* ***(b)*** *Nakon 20 sati uočava se gusta mreža peludnih mješinica (povećanje objektiva 10x).* Linija mjerila: 50 µm

Dokaz vijabilnosti peludi i intenzivnog metabolizma u zoni rastuće peludove tube bio je potvrđen i mikroskopiranjem nakon bojenja reagensom FDA. Intenzivno točkasto obojenje dokaz je nagomilavanja citoplazme i intenzivnog metabolizma u zoni izrastanja peludne mješinice (Slika 24).



Slika 24. Peludna zrna potaknuta na klijanje in vitro sorte Chardonnay, nakon bojenja sa reagensom FDA nakon 20 minuta naklijavanja (povećanje objektiva 10x). Na slici se uočava početak klijanja peludi odnosno prolazak peludove mješinice kroz jednu od apertura na sporodermi.

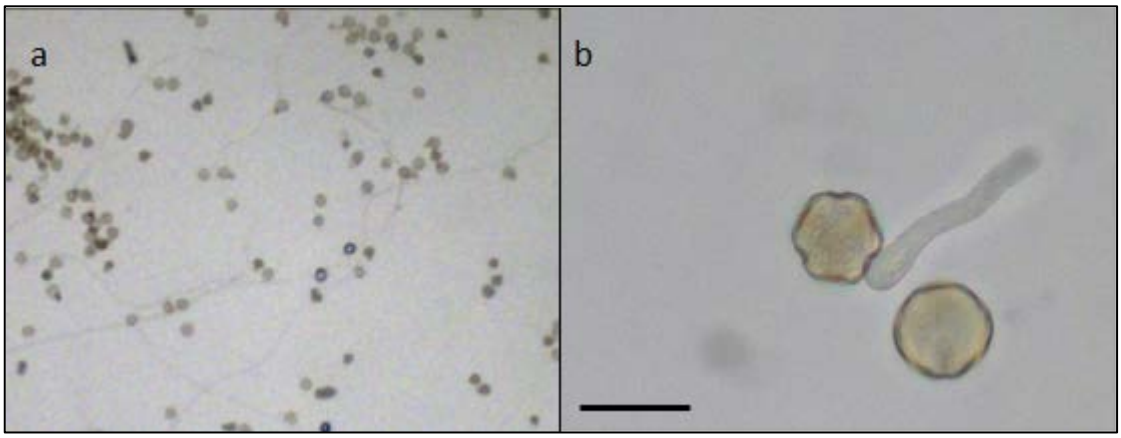
Na peludnim zrnima jasno su vidljive aperture na sporodermi (Slika 25). Kod sorte Chardonnay utvrđeno je da su u peludu prisutne dvije ili tri jezgre. Postojanje tri jezgre u peludnom zrncu dokaz je da se generativna jezgra podijelila drugom peludnom mitozom i stvorila dvije spermalne jezgre.



Slika 25. Dvojezgreni pelud sorte Chardonnay obojan propidij-jodidom. Uočava se vegetativna jezgra (V) i generativna jezgra (G). Na rubovima peludnog zrna uočavaju se tri intenzivnije obojena područja (zaokruženo) koja predstavljaju brazdice na površini sporoderme. (20x). Linija mjerila: 10 µm

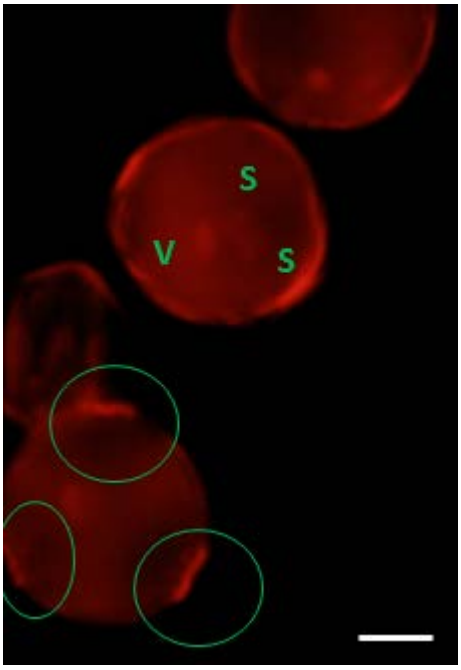
5.6.2 Klijavost peludi sorte Plavac mali *in vitro*

Naklijavanjem peludi sorte Plavac mali na hranjivom mediju utvrđena je dobra klijavost peludi nakon dva i dvadeset sati (Slika 26a i 26b). Međutim klijavost ipak nije bila u razini klijavosti sorte Chardonnay.

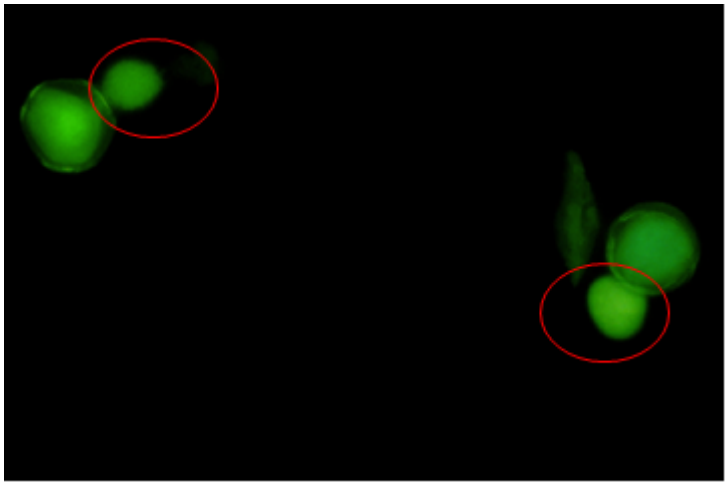


Slika 26. Klijanje peludi sorte Plavac mali in vitro. ***(a)*** *Do klijanja kod određenog broja peludnih zrnaca dolazi već nakon dva sata. Klijavost se uočava kao pojava peludovih cjevčica koje izrastaju iz peludnih zrnaca (5x)* ***(b)*** *Na većem povećanju (20x) na sporodermi uočavaju se zatamnjenja koja predstavljaju brazdice sa aperturama. Također na slici se uočava peludova cijev koja izlazi iz jedne od apertura. Linija mjerila: 30 µm*

Bojenjem peludovih zrnaca sorte Plavac mali propidij-jodidom također je utvrđeno postojanje dvojezgrene i trojezgrene peludi (Slika 27) kao i intenzivnija obojenja površine sporoderme koje predstavljaja aperture za klijanje. Vijabilnost te metabolička aktivnost peluda tijekom klijanja dokazana je i bojenjem FDA reagensom (Slika 28).



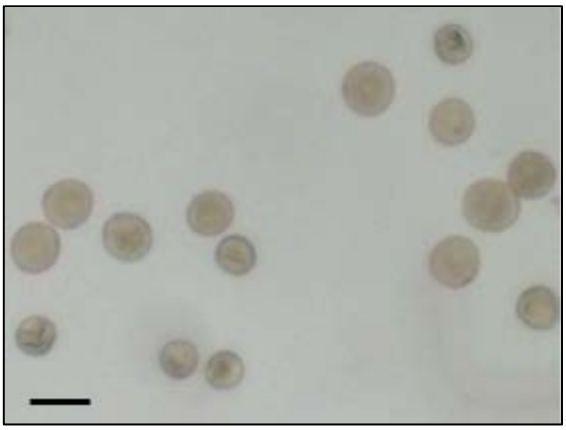
Slika 27. Trojezgreni pelud sorte Plavac mali obojan propidij-jodidom. Uočava se vegetativna jezgra (V) i dvije spermalne jezgre (S). Na rubovima peludnog zrna uočavaju se tri intenzivnije obojena područja (zaokruženo) koja predstavljaju brazdice na površini sporoderme (povečanje objektiva20x). Linija mjerila: 10 µm



Slika 28. Peludna zrna potaknuta na kjijanje in vitro sorte Plavac mali nakon bojenja sa reagensom FDA nakon 20 minuta naklijavanja (povečanje objektiva 10x). Na slici se uočava početak klijanja peludi odnosno prolazak peludove mješinice kroz jednu od apertura na sporodermi.

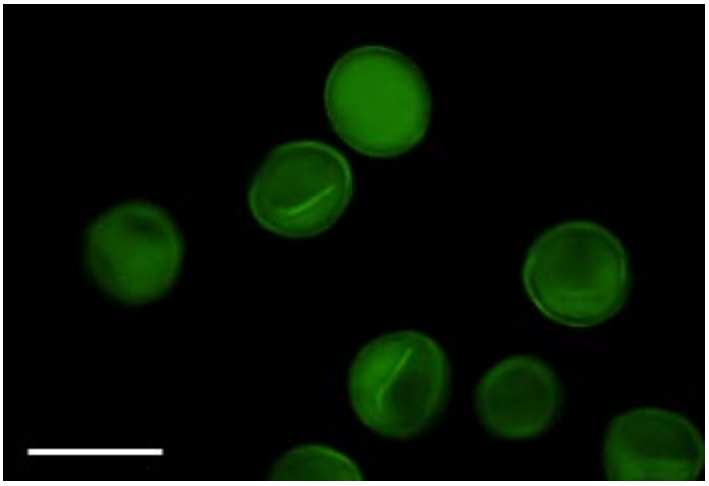
5.6.3 Klijavost peludi sorte Grk *in vitro*

Ispitivanje klijavosti peludi sorte Grk naklijavanjem na hranjivom mediju utvrđeni su poptuno drukčiji rezultati nego kod sorata Chardonnay i Plavac mali. Analizom polena pod lupom utvrđeno je da ne dolazi do klijanja niti nakon 20h (Slika 29).



Slika 29. Peludna zrnca sorte Grk ne pokazuju sposobnost klijanja niti nakon 20h. Dokaz je nepostojanje peludnih mješinica (10x). Linija mjerila: 30 µm

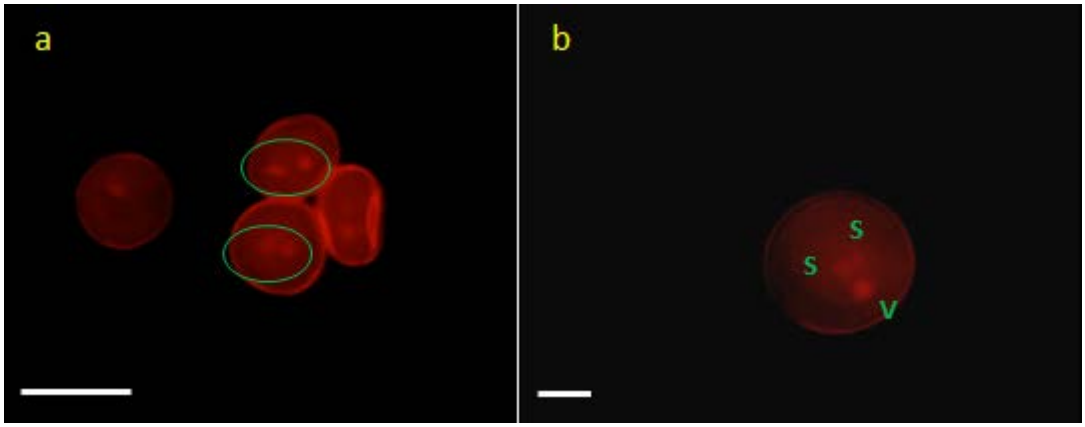
Naknadnom analizom polena pod mikroskopom nakon bojenja FDA reagensom utvrđena je fiziološka aktivnost odnosno vijabilnost peludi (Slika 30). Aktivnost je vidljiva unutar čitavog prostora matriksa peludi te nema intenzivno koncentriranog, točkastog, obojenje uz sporodermu peludi. Ovo dokazuje da nema intenzivne metaboličke aktivnosti na dijelu sporoderme na kojem bi se trebale nalaziti pore za klijanje a time i dokaz da ne dolazi do formiranja peludove mješinice.



Slika 30. Pelud sorte Grk. Mikroskopskom analizom utvrđeno je da 20 min nakon što je materijal nanesen na hranjivi medij ne dolazi do koncentriranja metabolita uz ovojnicu sporoderme koje se događa prilikom formiranja peludne mješinice (FDA). Linija mjerila: 30 µm

Bojenje peludi propidij jodidom imalo je za cilj utvrditi broj jezgara u citoplazmi peludnog zrna ali i postojanje apertura za klijanje peludi. Mikroskopiranjem peludi nakon bojenja utvrđeno je postojanje dvojezgrenog i trojezgrenog peludi (Slika 31). Time je potvrđeno da u jezgri peludi postoje normalno razvijene generativna i vegetativna jezgra. Također može se utvrditi da dolazi do diobe generativne jezgre čime nastaju dvije spermalne jezgre potrebne za dvostruku oplodnju. Promatranjem površine sporoderme ne može se uočiti zatamnjeni kontrast na rubovima koji je znak postojanja brazdica te apertura.

Stoga, kao najočitiji i glavni razlog nemogućnosti klijanja peludi kod sorte Grk je nepravilna građa sporoderme koja ne sadrži aperture nužne za izdužívanje i stvaranje peludove mješinice.



*Slika 31. Dvojezgrena **(a)** i trojezgrena **(b)** pelud u sorte Grk obojena propidij jodidom (10x). Na slici **(a)** označene su vegetativna i generativna jezgre peludi. Na slici **(b)** prikazana je trojezgrena pelud koji se sastoji od dvije spermalne jezgre **(S)** i jedne vegetativne **(V)**. Na obje slike na rubovima sporoderme nije uočljivo intenzivnije obojenje koje predstavljaju pore za klijanje. Linija mjerila: (a) 30 µm, (b) 10 µm*

5.7 Određivanje kompatibilnosti sorata oprašivača i sorte Grk

5.7.1 Fenološka kompatibilnost potencijalnih sorata oprašivača i Grka

Analizom fenološke kompatibilnosti u uvjetima kolekcijskog nasada utvrđene su razlike s obzirom na datum kada se pojedine sorte nalaze u periodu pune cvatnje (Tablica 4).

Tablica 4. Sorte u fenofazi cvatnje

Sorta	Datum cvatnje:*	
Grk	3.6.2012	11.6.2013
Plavac mali	4.6.2012	15.6.2013
Pošip bijeli	5.6.2012	15.6.2013
Chardonnay	31.5.2012	7.6.2013

*prema BBCH skali (kategorija 65- puna cvatnja- 50% otvorenih cvjetova)

Prema rezultatima iz tablice vidljivo je da postoje izražene razlike u trenutku kada se pojedine sorte nalaze u fazi pune cvatnje. Tako je utvrđeno da se u 2012. godini većina sorta nalazila u periodu pune cvatnje unutar pet dana dok su se Grk, Plavac mali i Pošip nalazili unutar razlike od tri dana. Iz navedenoga se može zaključiti da sve sorte koje predstavljaju potencijalne oprašivače imaju slično vrijeme cvatnje kao i sam Grk. U 2013. godini razlika u periodu pune cvatnje između najranije sorte Chardonnay (7.6.2013) i najkasnije sorte Pošip bijeli i Plavac mali (15.6.2013) iznosila je 8 dana. Pritome je puna cvatnja sorte Grk bila četiri dana nakon sorte Chardonnay i četiri dana prije sorata Pošip bijeli i Plavac mali. Iz navedenoga se može zaključiti da postoji očigledna razlika u vremenu cvatnje između navedenih sorata.

5.7.2 Utjecaj oprašivača na udio sjemenih bobica

Statističkom analizom utvrđene su razlike u broju oplođenih bobica ovisno o oprašivaču (Tablica 5). Usporedbom srednjih vrijednosti utvrđena je signifikantna razlika unutar pojedinih godina te u prosjeku obje godine. Pri tome je najveći broj sjemenih bobica u 2012. utvrđen nakon oprasivanja peludi sorte Plavac mali (49,17) i Pošip bijeli (45,17). Razlika između ova dva oprašivača nije bila signifikantna, međutim signifikantno različiti broj bobica u odnosu na prva dva oprašivača imala je sorta Chardonnay (17,27)

koja je time pokazala najslabije rezultate kod oprašivanja. Chardonnay je bio najslabiji oprašivač i u 2013 godini (2,19). Plavac mali je u istoj godini imao puno slabiji rezultat u broju bobica (4,36) od prethodne te se nije signifikantno razlikovao od sorte Chardonnay. Signifikantno veći udio sjemenih bobica u 2013 bio je utvrđen kod sorte Pošip bijeli (10,19).

U prosjeku godina najboljim oprašivačima su se pokazali Pošip bijeli (27,68) i Plavac mali (26,95) između kojih nije bilo signifikantne razlike. Kao najslabiji oprašivač utvrđena je sorta Chardonnay koja ima signifikantno najlošiji rezultat (9,73).

Kod kontrole, kao potencijalne samooplodnje, nije utvrđen razvitak sjemenih bobica, pa rezultat nije bio statistički uspoređen sa ostalim oprašivačima.

Tablica 5. Usporedba srednjih vrijednosti broja sjemenih bobica u grozdu ovisno o oprašivaču.

Oprašivač	**Udio sjemenih bobica u grozdu (%)**		
	2012	2013	Prosjek godina
Kontrola	0	0	0
Chardonnay	17,27 b*	2,19 b	9,73 b
Plavac mali	49,54 a	4,36 b	26,95 a
Pošip	45,17 a	10,19 a	27,68 a

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

Iz Duncan-ovog testa vidljivo je da udio sjemenih bobica značajno varira između godina, stoga je provedena i analiza ANOVA kako bi se utvrdila značajnost razlike između faktora u pokusu (Tablica 6). Ovom analizom utvrđena je visoko signifikantna razlika u svim faktorima pokusa. Razlika u rezultatu bila je je visoko signifikantna u odnosu na izbor oprašivača (F-79,87), u odnosu na promatranu godinu (F-18,53) kao i u rezultatima oprašivača u pojedinoj godini (F-11,07).

Tablica 6. Rezultat analize varijance udjela sjemenih bobica u grozdu s obzirom na korištene oprašivače u dvije godine istraživanja.

Faktor	F-vrijednost	Signifikantnost
Oprašivač	79,87	***
Godina	18,53	***
Oprašivač x godina	11,07	***

n.s. – nije signifikantno;*- signifikantno uz p<0,05; **p< 0,01 i ***p<0,001

Analizom bobica utvrđen je i prosječan broj sjemenki po bobici a statističkom obradom nije utvrđena razlika ovisno o izboru oprašivača (Tablica 7).

Tablica 7. Broj sjemenki u sjemenim bobicama kod različitih oprašivača*

Sorta oprašivač	Broj analiziranih grozdova	Prosječan broj sjemenki po sjemenoj bobici
Chardonnay	10	1,0743
Plavac mali	16	1,3381
Pošip	14	1,1812

*Analizom varijance nije utvrđena signifikantnost razlika

5.8 Utjecaj udjela pasolina na kemijska svojstva grožđa i vina

5.8.1 Polifenolni sastav sjemenih bobica i pasolina

5.8.1.1 *Sadržaj polifenola u kožici bobica*

Analizom sadržaja pojedinih polifenolnih spojeva u kožici utvrđeni su sljedeći spojevi iz skupine hidroksicimetnih kiselina: kaftarinska, kafeinska, kutarinska, kumarinska i sinapinska te iz skupine hidroksibenzojevih kiselina siringinska. Prosječne vrijednosti pojedinih kiselina prikazane su u tablici 8. Iz tablice je vidljivo da je u dvije godine utvrđena jedino kaftarinska kiselina. Na prosjeku godina statistička razlika nije utvrđena. U 2011. godini utvrđene su kafeinska i kumarinska a u 2012. godina kutarinska, sinapinska i siringinska. Signifikantna razlika utvrđena je je samo kod kutarinske i siringinske kiseline.

Tablica 8. Usporedba srednjih vrijednostiza sadržaj spojeva iz skupine fenolnih kiselina u kožici bobici (mg/kg).

		Kaftarinska	Kafeinska	Kutarinska	Kumarinska	Sinapinska	Siringinska
2011	Pasoline	0,92	0,97	-	0,46	-	-
	Sjemene bobice	0.00	0.00	-	1,09	-	-
2012	Pasoline	3,99	-	4,76a*	-	1,68	3,39a
	Sjemene bobice	2,97	-	1,49b	-	2,63	1,52b
Prosjek godina	Pasoline	1,87	-	-	-	-	-
	Sjemene bobice	1,06	-	-	-	-	-

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

Analiza sadržaja flavan-3-ola prikazana je u tablici 9. U kožici bobica i pasolina utvrđeno je prisutstvo sljedećih spojeva: katehin, epikatehin-galat, galokatehin. U obje godine utvrđen je jedino epikatehin-galat, dok je u 2011. utvrđen jedino epikatehingalat a u 2012. katehin, epikatehingalat i galokatehin. Signifikantne razlike u pojedinim godinama kao niti u prosjeku godina nisu utvrđene. Kod spoja epikatehingalat u prosjeku godina prosječno je veća koncentracija utvrđena u sjemenim bobicama.

Tablica 9. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva iz skupine flavan-3-ola u kožici bobice (mg/kg).

		Katehin	Epikatehingalat	Galokatehin
2011	Pasoline	-	0.00	-
	Sjemene bobice	-	6,46	-
2012	Pasoline	18,03	0,88	1,86
	Sjemene bobice	20,19	0.00	1,25
Prosjek godina	Pasoline	-	0,27	-
	Sjemene bobice	-	4,16	-

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

Iz skupine flavonola (Tablica 10) utvrđeni su: kvercitin-3-*O*- glukozid, kaempferol, kaempferol-3-*O*- glukozid i to samo u 2012. godini. Signifikantna razlika utvrđena je u 2012. godini kod spoja kvercitin-3-*O*- glukozid u korist pasolina. Spoj resveratrol u kožici grožđa utvrđen je samo u 2011. godini (Tablica 10.).

Tablica 10. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva iz skupine flavonola te resveratrola u kožici bobice (mg/kg).

		Kvercetin-3-*O*-glukozid	Kaempferol	Kaempferol-3-*O*-glukozid	Resveratrol
2011	Pasoline	-	-	-	2,06
	Sjemene bobice	-	-	-	1,61
2012	Pasoline	25,68a*	2,63	5,85	-
	Sjemene bobice	13,23b	2,67	5,3	-

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

Sadržaj spojeva iz skupine procijanidina u kožici bobica i pasolina bio je analitički istraživan samo u 2012. godini (Tablica 11). Od spojeva iz ove skupine utvrđeni su Procijanidin B1, procijanidin B2, procijanidin B4. Statističke razlike između sadržaja u pasolinama i sjemenim bobicama nisu utvrđene. Međutim iz prosjeka se mogu uočiti jasne

razlike u sadržaju pojedinih spojeva. Procijanidin B1 u kožici pasolina nije bio utvrđen dok je kod sjemenih bobica iznosio 9,83 mg/kg. Značajno veća koncentracija procijanidina B2 također je utvrđena kod sjemenih bobica (21,57 mg/kg) naspram svega 4,88 mg/kg u pasolinama. Prosječno najveća koncentracija procijanidina B4 utvrđena je u kožici pasolina (9,24 mg/kg) u odnosu na sjemene bobice, 2,74 mg/kg.

Tablica 11. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj spojeva iz skupine procijanidina u kožicama bobice u 2012 godini (mg/kg).

	Procijanidin B1	Procijanidin B2	Procijanidin B4
Pasoline	0.00*	4,88	9,24
Sjemene bobice	9,83	21,57	2,71

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test.*

5.8.1.2 *Sadržaj polifenola u mesu bobica*

Sadržaj pojedinih fenolnih spojeva iz skupina hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina u mesu bobica i pasolina prikazan je u tablici 12. Od pojedinih skupina utvrđeni su sljedeći spojevi: kaftarinska, kafeinska, fertartinska iz skupine hidroksicimetnih kiselina te galna i siringinska kiselina iz skupine hidroksibenzojevih kiselina. Kaftarinska i kafeinska utvrđene su u obje godine istraživanja. U obje godine, kao i na prosjeku godina ovih dviju kiselina utvrđene su signifikantne razlike između pasolina i sjemenih bobica. Signifikantno veća koncentracija kaftarinske i kafeinske bila je utvrđena kod pasolina. Kod fertarinske, galne i siringinske kiseline nisu utvrđene signifikantne razlike. Koncentracija galne kiseline bila je veća (21,99 i 22,23 mg/kg s.u.) u odnosu na sve ostale spojeve iz ove grupe spojeva.

Tablica 12. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva iz skupine hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina u mesu bobice (mg/kg).

		Kaftarinska	Kafeinska	Fertarinska	Galna	Siringinska
2011	Pasoline	3,96a*	1,05a	-	21,99	-
	Sjemene bobice	2,14b	0,58b	-	22,23	-
2012	Pasoline	0,5a	0,31a	0,53	-	1,11
	Sjemene bobice	0,4b	0,19b	0,49	-	1,06
Prosjek godina	Pasoline	3,09a	0,87a	-	-	-
	Sjemene bobice	1,7b	0,48b	-	-	-

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

Sadržaj pojedinih spojeva iz skupine flavan-3-ola prikazan je u tablici 13. Iz skupine flavan-3-ola utvrđeni su spojevi: katehin, epikatehin, epikatehin-galat i galatokatehin Signifikantna razlika u prosjeku godina utvređena je jedino kod katehina u korist pasolina. Statistički opravdana razlika ovoga spoja utvrđena je u obje promatrane godine kao i u prosjeku godina. Od ostalih spojeva prosječno najveće vrijednosti unutar prosjeka godina kod pasolina su utvrđene za epikatehin kod pasolina te epikatehin-galat u korist sjemenih bobica.

Tablica 13. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva iz skupine flavan-3-ola u mesu bobice (mg/kg s.u.).

		Katehin	Epikatehin	Epikatehingalat	Galokatehin
2011	Pasoline	13,47a*	2,5	0,35	-
	Sjemene bobice	3,91b	2,46	0,84	-
2012	Pasoline	0,42a	0,43	0,11	1,05
	Sjemene bobice	0,32b	0,4	0,04	0,49
Prosjek godina	Pasoline	10,21a	1,98	0,29	-
	Sjemene bobice	3,01b	1,95	0,64	-

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

Sadržaj pojedinih spojeva iz skupine flavonola te spoja resveratrola iz skupine stilbena utvrđen je samo u 2011. godini (Tablica 14). Iz skupine flavonola utvrđen je jedino spoj kvercetin-3-*O*- glukozid bez signifikantnih razlika. Signifikantna razlika utvrđena je jedino u korist pasolina.

Tablica 14. Usporedba srednjih vrijednosti signifikantnosti za sadržaj pojedinih spojeva iz skupine flavonola te resveratrola u mesu bobice (mg/kg).

		Kvercetin-3-O-glukozid	Resveratrol
2011	Pasoline	0,27	0,45a*
	Sjemene bobice	0,14	0,33b

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

Sadržaj spojeva iz grupe procijanidina je analitički utvrđen samo u 2012. godini (Tablica 15). Statistička razlika utvrđena je samo u sadržaju procijanidina B1 u korist pasolina. U pasolinama je također prosječno bila veća količina procijanidina B2 (0,2 mg/kg) koji u mesu sjemenih bobica nije utvrđen. Količina procijanidina B4 bila je jednaka i kod sjemenih bobica i pasolina.

Tablica 15. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj spojeva iz skupine procijanidina u mesu bobica u 2012 (mg/kg).

	Procijanidin B1	Procijanidin B2	Procijanidin B4
Pasoline	1,23a*	0,2	0,65
Sjemene bobice	0,28b	0	0,65

*Srednje vrijednosti označene različitim razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

5.8.2 Kemijski sastav mošta i vina i organoleptičko ocjenjivanje vina

5.8.2.1 *Kemijski sastav mošta*

Statističkom obradom podataka utvrđene su značajne statističke razlike u pojedinim sastavnicama mošta (Tablica 16) između sjemenih bobica i pasolina. Duncanovim testom utvrđena je signifikantna razlika u svim promatranim pokazateljima odnosno sadržaju šećera, sadržaju kiselina i pH. Signifikantno najveći sadržaj šećera utvrđen je u moštu sjemenih bobica u 2012. godini te u prosjeku godina. Signifikantno veći sadržaj kiselina bio je utvrđen kod pasolina u 2012. i 2013. godini kao i u prosjeku godina. Vrijednost pH bila je signifikantno viša kod varijante sjemenih bobica u 2012. i 2013. godini kao i u prosjeku godina.

Tablica 16. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj šećera, kiselina i pH u bobicama i pasolinama.

		Sjemene bobice	Pasoline
2012	Šećer (^{0}Oe)	92,25*a	86,65b
	Kiseline (g/l)	5,44b	6,91a
	pH	3,7a	3,35b
2013	Šećer (^{0}Oe)	73,44a	74,33a
	Kiseline (g/l)	7,96b	12,74a
	pH	3,65a	3,16b
Prosjek godina	Šećer (^{0}Oe)	88,80a	82,03b
	Kiseline (g/l)	5,90b	9,10a
	pH	3,69a	3,28b

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz $p<0,05$ korištenjem *Duncan's multiple range test*

Navedene razlike potvrđene su i analizom varijanci (Tablica 17). Pritome je kod većine sastojaka utvrđena visoko signifikantna razlika između godina, između tipa bobica te njihove interakcije. Nesignifikantna razlika utvrđena je jedino u slučaju kod interakcije godine i tipa bobice kod sadržaja šećera.

Tablica 17. Rezultat analize varijance za sadržaja šećera, kiselina i pH između sjemenih i nesjemenih bobica.

	Faktor	F vrijednost	Signifikantnost
Šećer (^{0}Oe)	Godina	73,54	***
	Vrsta bobica	4,66	*
	Godina x vrsta bobica	2,74	n.s
Kiseline (g/l)	Godina	186,03	***
	Vrsta bobica	55,48	***
	Godina x vrsta bobica	21,42	***
pH	Godina	89,92	***
	Vrsta bobica	346,27	***
	Godina x vrsta bobica	8,94	**

n.s. – nije signifikantno;*- signifikantno uz p<0,05; **p< 0,01 i ***p<0,001

Izračunom Pearsonovog koeficijenta korelacije između sadržaja šećera, kiselina i vrijednosti pH u odnosu na sadržaj sjemenih bobica (Tablica 18) utvrđeno je sljedeće: povećanje udjela sjemenih bobica na razini prosjeka godina negativno je korelirano sa sadržajem kiselina (-0,61) u pasolinama i u velikim bobicama (-0,73). Također, sa povećanjem broja sjemenih bobica događa se i signifikantno povećanje šećera kod sjemenih bobica (0,41), te visoko signifikantno povećanje vrjednosti pH kod pasolina (0,59).

S obzirom na pojedine godine u 2012. godini povećanje udjela sjemenih bobica u grozdu bilo je negativno korelirano sa sadržajem kiselina kod pasolina (-0,49) i velikih bobica (-0,56) te sadržaja šećera kod velikih bobica (-0,49). U 2013. godini nije utvrđena signifikantna korelacija između broja sjemenih bobica i pojedinih parametara kvalitete u pojedinom tipu bobica.

Tablica 18. Korelacija udjela sjemenih bobica u grozdu sa sadržajem šećera, kiselina i pH u pojedinom tipu bobica.

		2012	2013	Prosjek godina
Pasoline	Šećer (^{0}Oe)	-0,14 n.s.	-0,11 n.s.	0,27 n.s.
	Kiseline (g/l)	-0,49*	-0,19 n.s.	-0,61***
	pH	0,30 n.s.	-0,19 n.s.	0,59***
Sjemene bobice	Šećer (^{0}Oe)	-0,49*	-0,25 n.s.	0,41*
	Kiseline (g/l)	-0,56*	-0,31 n.s.	-0,73***
	pH	0,12 n.s.	0,40 n.s.	0,33 n.s.

n.s. – nije signifikantno;*- signifikantno uz p<0,05; **p< 0,01 i ***p<0,001

5.8.2.2 *Kemijski analiza i organoleptičko ocjenjivanje vina*

Parametri kemijske analize vina koji su obuhvaćeni statističkom analizom bili su sadržaj alohola (vol.%), ekstrakt bez šećera, nehlapive kiseline, pH, sadržaj pepela. Analizom je također obuhvaćena i završna ocjena organoleptičke analize vina.

Analizom kemijskog sastava vina (Tablica 19) u prosjeku godina signifikantna razlika utvrđena jedino kod sadržaja pepela pri čemu je najmanje pepela sadržavala varijanta P80 dok su ostale dvije varijante sadržavale podjednaku količinu pepela. Najveći ali ne i signifikantno najveći sadržaj alkohola u prosjeku godina imala je varijanta P20. Najveći udio ekstrakta bez šećera imala je varijanta P50. Najveći sadržaj nehlapivih kiselina te najmanji pH imala je varijanta P80. Ocjene degustacije na prosjeku godina također se nisu signifikantno razlikovale iako je najveću ocjenu dobilo vino varijante P80.

Signifikantna statistička razlika uočene su na razini pojedih godina. Signifikantno najveće razlike u 2011. godini zabilježene su između svih promatranih svojstava. Varijant P20 imala je signifikantno najveći sadržaja alkohola (vol%), ekstrakt bez šećerai, nehlapivih kiselina i pH vrijednost. Kod iste varijante signifikantno najmanja vrijednost utvrđena je za svojstvo pH vrijednost. Signifikantno najmanje vrijednosti svih promatranih parametara imala je varijanta P80.

U 2012. godini signifikantna razlika utvrđena je u sadržaju nehlapivih kiselina, pH i pepela.

Tablica 19. Usporedba srednjih vrijednosti za parametre osnovne kemijske analize.

		Alkohol (vol. %)	Ekstrakt bez šećera (g/l)	Nehlapive kiseline (g/l)	pH	Pepeo (g/l)
2011	P80	13,74b*	19,77b	5,45b	3,37c	1,64b
	P50	13,74b	19,80 b	5,38b	3,43b	1,83a
	P20	14,14a	20,63a	5,60a	3,46a	1,82a
2012	P80	14,37	17,07	4,91a	3,56b	1,58b
	P50	14,49	17,13	4,61ab	3,79ab	1,79ab
	P20	14,25	15,77	4,49b	3,79a	1,90a
Prosjek godina	P80	14,05	18,42	5,18	3,46	1,61b
	P50	14,11	18,47	5,00	3,61	1,81a
	P20	14,19	18,2	5,05	3,63	1,86a

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

Organoleptičkim ocjenjivanjem vina (Tablica 20) nje utvrđena statistički značajna razlika u ukupnim ocjenama između pojedinih varijanti vinifikacije iako je najvišu ocjenu u prosjeku godina dobilo vino varijante P80.

Tablica 20. Rezultati ocjenjivanja vina metodom 100 bodova (O.I.V., 1995)

		Ocjena vina metodom 100 bodova
2011	P80	79,67a*
	P50	80a
	P20	78,67a
2012	P80	80,67a
	P50	76,67a
	P20	76,67a
Prosjek godina	P80	80,17a
	P50	78,3a
	P20	77,67a

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test.*

5.8.2.3 *Sadržaj polifenolnih spojeva u vinu*

U vinu sorte Grk, od spojeva iz skupine hidroksicimetnih kiselina utvrđene su kafeinska, kumarinska, kaftarinska, ferulinska, fertarinska i sinapinska kiselina.

Analizom koncentracije spojeva iz grupe hidroksicimetnih kiselina (Tablica 21) u obje godine utvrđene su kafeinska i kumarinska kiselina. Signifikantno najveća koncentracija kafeinske kiseline u 2011. godini ali i u prosjeku godina utvrđena je u varijanti P80 odnosno u varijanti sa najvećim udjelom pasolina. Kumarinska je u vrlo niskim koncentracijama (0,17 mg/kg s.u.) utvrđena u varijanti P80 u 2011. godini te u varijanti P20 u 2012. godini (0,04 mg/kg s.u.). U prosjeku godina utvrđena je signifikantno najveća koncentracija u varijanti P80. Od ostalih spojeva u navedenoj varijanti P80 signifikantno veće koncentracije utvrđene su za ferulinsku u 2012. godina. Koncentracija kaftarinske, fertartinske i sinapinske bila je signifikantno veća kod varijante P20 ali samo u 2012. godini kada su navedene kiseline i detektirane u vinu.

Tablica 21. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva u vinu (mg/l) iz grupe hidroksicimetnih.

		Kafeinska	Kumarinska	Kaftarinska	Fertarinska	Ferulinska	Sinapinska
2011	P80	5,37a*	0,17	-	-	-	-
	P50	0,54c	0,00	-	-	-	-
	P20	0,85b	0,00	-	-	-	-
2012	P80	6,93	0,00	6,84b	1,71b	1,25a	0,15b
	P50	5,84	0,00	14,83a	2,02ab	1,07ab	0,22a
	P20	4,19	0,04	17,29a	2,2a	0,77b	0,2a
Prosjek godina	P80	6,15a	0,08a	-	-	-	-
	P50	2,52b	0,00b	-	-	-	-
	P20	3,19b	0,02ab	-	-	-	-

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

Analizom koncentracije spojeva iz grupe hidroksibenzojevih kiselina (Tablica 22) tijekom obje godine utvrđena je jedino galna kiselina. Signifikantna razlika utvrđena je jedino u 2011. godini u korist varijante P80 dok 2012. godine i u prosjeku godina

signifikantna razlika nije utvrđena iako je prosječno najveća koncentracija galne kiseline u oba slučaja bila kod varijante P80.

Kod koncentracije galne kiseline utvrđene su izrazito velike razlike u koncentracijama između godina (2011. od 20,79-25,48 mg/kg s.u. naspram 2012. godine- od 1,1 do 1,13 mg/kg s.u.). Navedene razlike mogu se pripisati razlikama u klimatskim prilikama između dvije godine.

Tablica 22. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva u vinu (mg/l) iz grupe hidroksibenzojevih kiselina.

		Siringinska	Galna
2011	P80	-	25,48a*
	P50	-	22,18b
	P20	-	20,79b
2012	P80	0,97	1,13
	P50	1,11	1,11
	P20	2,27	1,1
Prosjek godina	P80	-	13,30
	P50	-	10,94
	P20	-	11,65

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

Od spojeva iz grupe flavan-3-ola (Tablica 23) utvrđeni su katehin, epikatehin, galokatehin, epikatehin- galat, epigalakto- katehin. Katehin i epikatehin jedini su spojevi utvrđeni tijekom obje godine istraživanja. Sadržaj flavan-3-ola u vinu varirao je ovisno o godini. U 2011. detektirani su katehin, epikatehin i epikatehin- galat. Sadržaj katehina i epikatehina bio je signifikantno najviši u 2011. kod varijante P20. Signifikantno najveća koncentracija epikatehin- galata utvrđena je u varijanti P50.

U 2012. godini nisu utvrđene signifikantne razlike između varijanata što se tiče spojeva iz grupe flavan-3-ola. Od spojeva su utvrđeni katehin, epikatehin, galokatehin, epikatehin- galat, epigalakto- katehin. Međutim utvrđena koncentracija katehina u 2012. godini bila je višestruko niža nego u 2011. (3,19 mg/l u 2012. naspram 31,69 mg/l u

2011.). Kao i u slučaju galne kiseline i kod spojeva katehin i epikatehin utvrđene su izrazite razlike u koncentraciji između dvije godine. Ove razlike također možemo pripisati različitim klimatskim prilikama koje su utjecale na konačnu koncentraciju spojeva u grožđu. Statistička razlika utvrđena je jedino kod spojeva katehin i epikatehin u 2011. godini pri čemu je signifikantno veća koncentracija obaju spojeva utvrđena u varijanti P20. U prosjeku godina između varijanati vinifikacije nisu utvrđene signifikantne razlike

Tablica 23. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva u vinu (mg/l) iz grupe flavan-3-ola.

		Katehin	Epikatehin	Galokatehin	Epigalakto-katehin	Epikatehin galat
2011	P80	25,02b*	5,22c	-	-	0,00
	P50	24,91b	6,87b	-	-	3,60
	P20	31,69a	9,06a	-	-	0,00
2012	P80	1,94	1,82	0,81	94,98	0,15
	P50	2,69	3,54	0,65	98,50	0,14
	P20	3,19	3,14	1,35	105,04	0,06
Prosjek godina	P80	13,48	3,52	-	-	0,08b
	P50	13,79	5,20	-	-	1,87a
	P20	17,44	6,10	-	-	0,07b

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz $p<0,05$ korištenjem *Duncan's multiple range test*

Od spojeva iz skupine flavonola utvrđen je samo rutin (Tablica 24) i to obje godine istraživanja. U obje godine utvrđena je signifikantna razlika i to u korist varijante P80. Također u obje godine istraživanja je utvrđen i resveratrol a signifikantno najveća koncentracija ovoga spoja u obje godine utvrđena je također kod varijante P80.

Tablica 24. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva u vinu (mg/l) iz grupe flavonola te resveratrola.

		Rutin	Resveratrol
2011	P80	1,08a*	0,33a
	P50	0,91b	0,30b
	P20	0,85b	0,31b
2012	P80	11,83a	0,53a
	P50	11,28ab	0,45a
	P20	6,74b	0,33b
Prosjek godina	P80	6,46	0,43a
	P50	6,1	0,37ab
	P20	3,8	0,32b

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar godina i prosjeka godina razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

U 2012. godini utvrđena je signifikantna razlika u sadržaju procijanidina između triju varijanati vina (Tablica 25). Procijanidin B1 je bio utvrđen jedino kod varijante P80. Sadržaj procijanidina B2 bio je signifikantno najviši u varijanti sa P20. Koncentracija procijanidina B4 bila je signifikantno najviša u varijanti P50.

Tablica 25. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj spojeva iz skupine procijanidina u vinu u 2012. godini (mg/l).

	Procijanidin B1	Procijanidin B2	Procijanidin B4
P80	1,34	1,95b*	1,08ab
P50	0,00	2,06b	1,18a
P20	0,00	2,41a	0,97b

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima razlikuje se statistički značajno uz p<0,05 korištenjem *Duncan's multiple range test*

6 RASPRAVA I ZAKLJUČAK

6.1 Građa muškog i ženskog gametofita

Kultivirane sorte vinove loze najčešće imaju hermafroditni tip cvijeta dok samo rijetke među koje spada i Grk imaju funkcionalno ženski cvijet. Kod sorte Grk cvijet sadrži prašnike i tučak, no prašničke niti su savijene u smjeru suprotnom od cvjetne osi, a u prašnicama se razvija veliki broj neklijavih peludnih zrnaca. Navedena svojstva u skladu su s opisom funkcionalno ženskih cvjetova vinove loze (Vasconcelosa i sur. 2009).

Mikroskopiranjem peludi ispitana je po prvi puta građa peludi hrvatskih autohtonih sorata vinove loze, Grk i Plavac mali. Utvrđeno je da kod sorte Grk, koja posjeduje ženski cvijet, građa peludi odgovara onoj opisanoj u većine sorata s ovakvim tipom cvijeta (May, 2004; Stout, 1971). Takva pelud ne sadrži brazdice i aperture za klijanja na sporodermi. Iz toga razloga ne može doći do prodiranja peludne mješinice kroz sporodermu. Rezultat toga je sterilnost peludi.

Osim nepostojanja pora na vanjskoj ovojnici peludi, razlog muške sterilnosti može biti stvaranje peludnih zrna umanjene vijabilnosti, te je njihov velik udio u fazi zrelosti nevijabilan (Oberle, 1938.). U ovom radu utvrđeno je, bojanjem bojom FDA, da su gotovo sva peludna zrna predmetnih sorata pa i Grka, vijabilna u trenutku oprašivanja. Utvrđeno je postojanje vegetativne i dviju spermalnih jezgara u zrelom peludnom zrnu čime je dokazano da je zreli muški gametofit formiran.

Rezultati stoga ukazuju da se sorta Grk od ostalih ispitanih sorata visoke muške fertilnosti razlikuje po nemogućnosti formiranja i prodiranja peludne mješinice uzrokovanog nepostojanje pora za klijanje (apertura).

Bojanje polenovih zrnaca bojom FDA ukazalo je na intenzivnu metaboličku aktivnost u području prodiranja i klijanja peludne mješinice (intenzivno zeleno obojenje na slikama). Intenziviranje obojenja u blizini apertura ukazuje na relokalizaciju citoplazme i staničnih organela, te porastu metaboličke aktivnosti u zoni klijanja. Lokalizacija obojenja odnosno intenzivne metaboličke aktivnosti, s druge strane, nije vidljiva kod sorte Grk.

Pojava funkcionalno ženskoga cvijeta kod sorata vinove loze u praktičnom smislu uvjetuje značajne probleme prilikom njihova korištenja u vinogradarstvu. Kako je pelud sterilna prilikom cvatnje ne može doći do procesa samooplodnje koja predstavlja dominantan način oplodnje kod vinove loze (May, 2004), te do normalne embriogeneze i razvitka usploda. Važno je istaknuti da se u vinove loze kao posljedica stranooplodnje

razvija se svega 1-2 % sjemenki (Antcliff, 1980., preuzeto iz May, 2004). Podatak ukazuje na važnost samooplodnje ali i nužnost odabira najbolje sorte za oprašivanje za svaku interesantnu sortu s muškom sterilnosti.

Uslijed loše kvalitete ovih procesa grozd ostaje rehuljav s vrlo malo bobica ili pak sa velikim udjelom malih nerazvijenih često nezrelih bobica. Kod sorte Grk upravo je pojava takvih malih besjemenih ali zrelih bobica ono što pored funkcionalno ženskoga cvijeta sortu čini specifičnom. Unutar sortimenta Republike Hrvatske postoji još nekoliko sorata koje posjeduju funkcionalno ženski cvijet: Blatina crna, Cetinka bijela, Dišeća ranina i dr. međutim niti jedna od njih ne pokazuje tako visok stupanj pojave besjemenih bobica u grozdu poput sorte Grk (Mirošević i sur., 2008). Odnos udjela malih besjemenih bobica i onih velikih, oplođenih koje sadrže sjemenku vrlo je varijabilan. Taj odnos može ekstremno varirati, od potpune oplodnje (sve bobice u grozdu su sjemene), pa do stopostotnog udjela besjemenih bobica. Kako je pojava besjemenskih bobica kod vinove loze uvjetovana dvama procesima, partenokarpijom ili stenospermokarpijom (Stout, 1936, Pratt, 1971, Staudt 1985) visoki udio besjemenih bobica kod sorte Grk, pokušava se objasniti jednim od ova dva ili eventualno apomiksijom.

U slučaju stenospermokarpije dolazi do normalne oplodnje i početnoga razvoja embrija međutim u određenoj fazi razvoj sjemenke a time i razvoj bobice se zaustavlja (May, 2004). Proces partenokarpije podrazumijeva razvoj bobice bez oplodnje. Kod partenokarpije ne dolazi do oplodnje dok je oprašivanje često važan okidač partenokarpnog razvitka (Staudt, 1985).

Apomiksija je kod cvijetnica definirana kao formiranje sjemenke i razvoja embrija bez oplodnje, iz majčinskog staničja u kojeg prethodno nije došlo do procesa mejoze kao niti do oplodnje (Koltunow i sur. 1995; Bicknell i Koltunow 2004). Ovaj proces opisan je kod više od 400 vrsta cvjetnica uključujući unutar 40 rodova (Carman, 1997). Od ukupnog broja spomenutih vrsta 75% ih pripada u tri roda, Asteraceae, Rosaceae i Poaceae koje čine ukupno 10% vrsta cvjetnica.

Diplosporija i aposporija predstavljaju mehanizme apomiksije koji se još nazivaju gametofitnom embriogenezom. Pri ovim procesima razvoj embrija induciran je ili iz diploidne stanice iz koje se formira majčinska stanica megaspore (arhesporijalne stanice) pri diplosporiji ili iz jedne od stanica susjednih arhesporijalnoj stanici pri aposporiji (Schmidt i sur., 2015.). Zajednički je pak izostanak redukcijske diobe, mejoze a embrio se razvija iz nereducirane embrionske vreće bez oplodnje. Kako bi došlo do razvoja

endosperma u pravilu je potrebna oplodnja dok kod manjeg broja apomiktičnih vrsta oplodnja nije potrebna. Razvoj i uspješnost preživljavanja ovakvih embrija ovisi o razvoju endosperma ovisnom o oplodnji središnje stanice (Bicknell i Koltunow, 2004), ili dolazi do prekida razvitka embrija.

Analizom ženskog gametofita kod sorte Grk utvrdio sam postojanje normalno razvijenog jajnog aparata kao i samog sjemenog zametka netom prije oplodnje. Uočljivi rast sjemenih zametaka nakon oplodnje kod grozdova na kojima nije bila provedena izolacija počinje u stadiju plodnica veličine 4–5 mm, te je to razvojna točka u kojoj uočavamo kod Grka visoku stopu abortivnosti većine sjemenih zametaka. Analizom veličine bobice utvrđeno je da su bobice kod neizoliranih grozdova tri dana nakon polinacije imale promjer otprilike 3 mm. Kod takvih je bobica utvrđeno propadanje nekih, ali ne svih sjemenih zametaka. Analizom broja sjemenih zametaka koji nastavljaju razvitak pokazano je da kod sorte Grk plodnice promjera 4 mm sadrže najčešće dva razvijajuća sjemena zametka, dok se u plodnicama od 5 mm najčešće nalazi samo 1 razvijajući sjemeni zametak. U plodnicama od 7 mm broj sjemenih zametaka iznosi ili 1 ili ih uopće nema, što ukazuje na visoku stopu abortivnosti sjemenih zametaka sorte Grk. Analizom udjela razvijenih sjemenih zametaka u 78 % analiziranih plodnica veličine 4 do 5 mm sorte Grk dogodila se degeneracija sjemenih zametaka i abortiranje embrija, a zreli su se embriji razvijali tek u 28% analiziranih plodnica. Kod sorata Plavac mali i Chardonnay u toj se fazi u svim plodnica razvijalo jedan ili dva sjemena zametka (razlog intenzivnog rasta usploda), te njihov broj više nije značajnije odstupao. Propadanje sjemenih zametaka u ranim stadijima razvitka posljedica je izostanka oplodnje pojedinog zametka ili općenitog izostanka oplodnje, oplodnja ili oplođeni sjemeni zametak inhibira razvitak neoplođenih. Propadanje u kasnijim stadijima razvitka posljedica je stenospermokarpije odnosno propadanja razvijajućeg embrija. Degenerirani embriji ili abortirani sjemeni zameteci uočljivi u plodnicama sorte Grk navedene veličine indiciraju da je do procesa abortiranja embrija ili sjemenog zametka došlo tijekom embriogeneze a ne neposredno nakon oplodnje. Ove činjenice podupiru stenospermokarpiju kao glavni mehanizam koji dovodi do propadanja sjemenih zametaka u oplođenim bobicama.

U istraživanjima, kao što je spomenuto, proveden je postupak izolacije cvatova prije cvatnje kako u periodu cvatnje ne bi došlo do oprašivanja polenom ostalih sorata. Ovime je izbjegnuta mogućnost pojave stranooplodnje. Također, istraživanjem u ovoj doktorskoj disertaciji utvrđeno je da je polen sorte Grk neklijav, pa stoga nije moguća niti pojava samooplodnje. Kod spomenutih izoliranih cvatova u očitoj nemogućnosti da dođe do stranooplodnje i samooplodnje, nakon cvatnje je ipak došlo do razvoja bobica. Navedene

bobice u punoj zrelosti bile su karakteristične građe za pasoline, bez sjemenke, sitne, značajno manjeg volumena od oplođenih sjemenih bobica ali zrele. Sve pasoline, kako one kod neizoliranih cvatova, cvatova iz induciranoga oprašivanja ali i iz izolacije, karakterizirao je početni rast i razvoj do određenog volumena ali i sve kasnije faze razvoja i zriobe takovih bobica.

Kako je kod navedenih grozdova bila nemoguća pojava stenospermokrapije ona je kao mehanizama nastanka besjemenih bobica kod izoliranih grozdova u potpunosti odbačena. Jedini način prema literaturi (Stout, 1936, Pratt, 1971) koji se navodi kao uzrok nastanka malih, besjemenih bobica kod vinove loze jest partenokarpija odnosno stimulativna partenokarpija. Kod stimulativne partenokarpije dovoljan je tek kontakt njuškice tučka i peludnog zrna kako bi došlo do indukcije signala za razvoj bobice. Kako tijekom procesa cvatnje kod sorte Grk prašnice pucaju i optuštaju veliki broj peludnih zrnaca u okolinu, velika je vjerojatnost da je svaka njuškica tučka došla u kontakt sa peludnim zrncima.

Kako bi analizirali građu sjemenoga zametka i dinamiku razvoja ovakovih bobica provedena je usporedba sa građom cvjetova i netom zametnutih plodova kod ostalih sorata u istraživanju ali i bobica sa inducirano oprašenih cvati. Usporedbom sa bobicama iz inducirano oprašenih cvati cilj je bio utvrditi razlike između malih besjemenih bobica, pasolina, i onih velikih, sjemenih bobica.

Ispitivanjima je utvrđeno je da su bobice kod izoliranih grozdova pet dana nakon pune cvatnje bile manjega promjera od bobica sa grozdova kod kojih je provedeno iducirano oprašivanje polenom sorte Chardonnay. Promjer bobica sa izoliranih cvati iznosio je u prosjeku 2,6 mm dok je kod bobica sa inducirano oprašenih cvati prosječan promjer iznosio 3,2 mm. Bobice sa izoliranih cvati/grozdova su i tijekom idućih deset dana nakon perioda pune cvatnje imale u prosjeku za 0,5 mm manji promjer od bobica sa inducirano oplođenih grozdova (Graf 9). Nakon perioda od deset dana bobice sa inducirano oplođenih grozdova počinju intenzivno rasti te 20 dana od pune cvatnje imaju prosječan promjer od 8,5 mm dok bobice sa izoliranih grozdova imaju prosječan promjer od 4 mm (Graf 9). Kod grozdova iz izolacije utvrđen je 100%-tni udio bobica koje se razvijaju do navedenog promjera od 4 mm. Analizom tijekom pokusa i kasnije u punoj zrelosti nije utvrđeno postojanje sjemenke u ovim bobicama, pa stoga možemo zaključiti da ove bobice predstavljaju male besjemene bobice odnosno pasoline.

Na pojedinim grozdovima u vrijeme pune cvatnje bile su uočene bobice prosječno većih dimenzija kod kojih nije došlo do otpadanja cvjetne kapice. One su definirane kao neoplođene. Promjer ovakvih plodnica u vrijeme pune cvatnje odgovarao je promjeru

oplođenih plodnica 3 – 5 dana nakon polinacije, što je odgovaralo veličini od čak 5 mm. One su nastavljale rasti do 7 mm promjera, prilikom čega su postepenu kržljali i propadali svi sjemeni zametci, do njihovog potpunog nestanaka u plodnicama promjera 7 mm.

Unatoč pretpostavci o neodvijanju oplodnje, analiza sjemenih zametaka ovakovih bobica ukazuje na pravilnost ranih faza embriogeneze. Unutar embrionske vreće neposredno nakon „oplodnje“ utvrđeno je postojanje zigote u fazi intenzivnog izduživanja (Slika 11a). Također je očito da obje sinergide izgledaju jednako i nedegenerirano (Slika 11b), što je suprotno u usporedbi s degeneracijom sinergide u sorte Chardonnay (Slika 8a). Izduživanje zigote jedan je od prvih vidljivih događaja nakon oplodnje, odnosno događaj koji prethodi prvoj staničnoj diobi u embriogenezi (Leljak-Levanic i sur. 2015). Morfološkom analizom i analizom gametofita ovakovih bobica uočeno je nekoliko vrlo intrigantnih činjenica. Prva činjenica je pokrivenost njuškice tučka kaliptrom. Nakon što se kaliptra raspuca ostaje priljepljena na njuškicu tučka što onemogućava bilo kakav kontakt sa peludi a time ibilo kakav početni signal važan za partenokarpni razvoj bobice.

Druga činjenica je da u sjemenom zametku ovih bobica ne vidimo kanal kroz koji je urasla polenova mješinica te nema, inače uočljivog propadanja sinergide kroz koju se dogodio prodor peludne mješinice u ženski gametofit. Sva ova opažanja ukazuju na izostanak oplodnje.

Ovaj rezultat predstavlja indikaciju da kod funkcionalno ženske sorte vinove loze, sorte Grk ne samo razvitak ploda (partenokarpija) nego eventualno i razvitak embrija može odpočeti neovisno o događaju oplodnje. Ove činjenice ukazuje na mogućnost pojave ne samo partenokarpije već i apomiksije. U prilog ove ideje ide i činjenica da apomiksija podrazumijeva izostanak redukcijske diobe zbog čega se razvija diploidni ženski gametofit u nešto ranijem vremenskom okviru. Tako zbog preskakanja mejoze embriogeneza može otpočeti ranije nego kod normalno razvijajućih ženskih gametofita što može prouzročiti preuranjeni rast plodnica. Kako pojava procesa apomiksije kod vinove loze nije do sada utvrđena ovu pretpostavku treba analizirati dodatanim i opsežnim istraživanjima.

Općenito, pojavu manjih i većih bobica u zrelom grozdu možemo povezati sa stupnjem propadanja sjemenih zametaka pri čemu možemo pretpostaviti da su male bobice upravo one u kojima su propali svi sjemeni zametci bilo zbog izostanka oplodnje, bilo zbog prekida embriogeneze i naknadnog propadanja oplođenog sjemenog zametka (stenospermokarpija). U tim je slučajevima došlo do posljedičnog usporavanja rasta i propadanja bobice. Određen partenokarpni rast postojao je tek u najranijim fazama vjerojatno kao posljedica drugih signalnih mehanizama npr. samog oprašivanja u istom

cvatu (Pratt, 1971). Veći tipovi bobica rezultat su uspješnog razvitka barem jednog sjemenog zametka (bobice sa sjemenkom), ali i stenospermokarpije u slučaju većih besjemenih bobica. Stoga zaključujemo da su besjemene bobice u sorte Grk mogu biti posljedica i partenokarpije i stenospermokarpije, no ove procese mozemo razlikovati po sinhroniziranom propadanju svih sjemenih zametaka (partenokarpija) ili po dominaciji jednog sjemenog zametka koji propada u kasnijim razvojnim stadijima (stenospermokarpija).

S obzirom na sve ranije navedeno, kako bi se osigurala kvalitetna oplodnja kod sorte Grk u proizvodnim nasadima potrebno je saditi sorte oprašivača koje razvijaju fertilna peludna zrna s visokom stopom kompatibilnosti, odnosno koja bi omogućavala potpuno odvijanje pravilne embriogeneze i razvitka

6.2 Određivanje kompatibilnosti sorata oprašivača i sorte Grk

6.2.1 Fenološka kompatibilnost potencijalnih sorata oprašivača i Grka

Analizom fenološke kompatibilnosti utvrđeno je da postoje razlike u vremenu cvatnje promatranih sorata oprašivača između dviju promatranih godina. U 2012. godini sve sorte su u punoj cvatnji bile u gotovo isto vrijeme dok je tijekom 2013. god. trenutak pune cvatnje između sorata bio izrazito drugačiji. Iz toga se može se zaključiti da kompatibilnost cvatnje ovisi o brojnim čimbenicima, prije svega klimatskim prilikama. Iako nije rađena statistička analiza podataka za ovaj tip praćenja ipak je vidljivo da se sorta Grk nalazi u fazi pune cvatnje ranije nego sorte Plavac mali i Pošip bijeli koje se najčešće uzgajaju u domicilnom području uzgoja sorte Grk, pa su time i potencijalni oprašivači. S ciljem utvrđivanja kompatibilnosti u vremenu cvatnje bilo bi potrebno provesti detaljnija istraživanja s više sorata i kroz duži niz godina.

6.2.2 Utjecaj oprašivača na udio sjemenih bobica

S obzirom na ciljeve istraživanja, analizom udjela sjemenih bobica utvrđena je velika zavisnost o izboru sorte oprašivača ali očito i o drugim, okolinskim čimbenicima, te kondiciji vinograda.

Analizom utjecaja oprašivača primarno je dokazano da kod grozdova koji su bili u izolaciji, čime je bio onemogućen proces stranooplodnje, nije došlo do razvoja sjemenih bobica. Kako je ranije utvrđeno kod većine bobica sa grozdova iz izolacije došlo je do

početnoga razvoja pri čemu su one do osmoga dana od zrelosti za oplodnju pratile rast sjemenih bobica sa inducirano oprašenih grozdova. Nakon osam dana njihov rast zaostaje u odnosu na sjemene bobice te 20 dana nakon pune cvatnje ovakove bobice dostižu promjer 4 mm a također ne sadrže razvijene sjemenke. Takve bobice definirane su kao pasoline. Pojava ovakovih malih, besjemenih, bobica kod izostanaka procesa oplodnje nije karakteristična za ostale sorate sa funkcionalno ženskim cvijetom kod kojih se kod izostanka oplodnje većina cvjetova nakon cvatnje osuši i otpadne uslijed čega grozdovi ostaju rehuljavi. Najveći dio bobica sa grozdova kod kojih je provedeno inducirano oprašivanje nakon dvadeset dana imale su promjer 8,5 mm te su sadržavale sjemenku. Ove bobice svrstane su u kategoriju sjemenih bobica. Kako je ranije dokazano da je pelud sorte Grk sterilna može se zaključiti da je kod grozdova u izolaciji došlo do partenokarpije. Također u vrećicama za emaskulaciju nakon skidanja sa grozdova nisu uočeni otpali posušeni cvjetovi što navodi na činjenicu da nije došlo do osipanja nakon cvatnje. Pojava osipanja cvjetova karakteristična je za sorte sa hermafroditnim tipom cvijeta (May, 2004; Jackson, 2008).

Kako bi se utvrdio utjecaj oprašivača na kvalitetu oplodnje utvrđen je i prosječan broj sjemenki po oplođenoj bobici. Statističkom analizom nije utvrđena signifikantna razlika u broju sjemenki ovisno o oprašivaču (Tablica 5). Uočeno je da većina sjemenih bobica posjeduje jednu normalno razvijenu sjemenku, što je kasnije potvrđeno i izračunom prosjeka broja sjemenki u sjemenoj bobici. Tako se, ovisno o oprašivaču, broj sjemenki kreće između 1,07 (Chardonnay) i 1,33 (Plavac mali) po bobici (Tablica 5). Ovo zapažanje i rezultati navode na zaključak da je za pravilan razvoj bobice dovoljno da dođe do oplodnje samo jednog sjemenog zametka nakon čega se razvija sjemenka i bobica većega obujma tj. sjemena bobica.

6.3 Utjecaj udjela pasolina na kemijska svojstva grožđa i vina

6.3.1 Polifenolni sastav sjemenih bobica i pasolina

Iz skupine hidroksicimetnih kiselina u kožici i mesu sjemenih bobica i pasolina u obje godine utvrđena je jedino prisutnost kaftarinske. Značajna prisutnost kaftarinske kiseline potvrđuje činjenicu kako je ova kiselina najzastupljenija u bijelim vinima (Kumušta, 2012; Betes-Saura, 1996, Okamura i Watanabe, 1981). Jedna od najzastupljenijih kiselina bila je i kafeinska koja je utvrđena u mesu bobica tijekom obiju godina dok je u kožici utvrđena jedino u 2011. godini. Koncentracija kaftarinske kiseline kretala se između 1.06 do 3,96 mg/kg s.u.[2] a kafeinske od 0.48 do 0.87 mg/kg s.u. Od ostalih spojeva u kožici oba tipa bobica bile su prisutne kumarinska, kutarinska i sinapinska a u mesu je bila je prisutna samo fertartinska kiselina. U ukupnom sadržaju najzastupljenija je bila kutarinska (1,49 do 4,76 mg/kg s.u.) koja je bila utvrđena samo u kožici sjemenih bobica i pasolina te samo u 2012. godini.

Od hidroksibenzojevih kiselina u kožici i mesu oba tipa bobica utvrđena je jedino siringinska kiselina čija se koncentracija kretala od 1,06 do 3,39 mg/kg s.u.. Siringinske kiseline je bilo utvrđeno najviše u kožici pasolina. Galna kiselina bila je prisutna samo u mesu oba tipa bobica i to samo u 2011. godini a signifikantnih razlike u koncentraciji između dva tipa bobica nije bilo. Iako je ukupno gledajući ova kiselina bila najviše zastupljeni polifenolni spoj u grožđu, u vinu su ovakovi visoki rezultati utvrđeni samo u 2011. godini. Kako se radi o ekstremnim razlikama između godina, pretpostavka je da je sadržaj ove kiseline izrazito ovisan o okolišnim uvjetima.

Od spojeva iz skupine flavan-3-ola značajno veći broj spojeva je utvrđen u mesu bobica. Utvrđeni spojevi u obje godine bili katehin, epikatehin i epikatehingalat dok je u galokatehin utvrđen jedino u 2012. godini. Epikatehin galat utvrđen je i u kožicama svih tipova bobice tijekom obje godine istraživanja. Signifikantne razlike između pojedinih tipova bobica utvrđene su samo za spoj katehin u mesu bobice pri čemu je signifikantno veća koncentracija katehina utvrđena kod pasolina. Navedene rezultati navode na zaključak da je više polefinelonih spojeva utvrđeno u mesu bobica. Također najzastupljeniji spojevi u grožđu su katehin i epikatehin te spojevi epikatehina i galne kiseline (epikatehingalat i galokatehin) što je u skladu sa prijašnjim istraživanjima (Andabaka, 2015; Smith i Waters, 2012).

Od spojeva iz skupine flavonola niti jedan spoj nije utvrđen u obije godine istraživanja pa možemo zaključiti da njihova sinteza u grožđu ovisi o klimatskim

[2] miligrama po kilogramu svježeg uzorka

osobinama godine. Utvrđeni spojevi u kožici su utvrđeni kvercitin-3-*O*-glukozid, kaempferol i kaempeferol-3-*O*-glukozid dok je u mesu utvrđen jedino kvercitin-3-*O*-glukozid. Veći broj spojeva iz ove skupine potvrda je prijašnjim istraživanjima (Smith i Waters, 2012; Katalinić i sur., 2010) prema kojima je kožica bobice bogatija navedenim spojevima.

Resveratrol iz skupine stilbena utvrđen je i u kožicama i u mesu kod oba tipa bobica u 2011. godini, dok u 2012. nije detektiran. Signifikantne razlike u koncentraciji utvrđene su jedino u mesu boce i to u korist pasolina.

Kod spojeva iz grupe procijanidina utvrđena je najveća razlika u koncentraciji između bobica i pasolina. Veća koncentracija (ne i statistički opravdana) procijanidina B1 i procijanidina B2 utvrđena je u bobicama naspram pasolina. U pasolinama je utvrđena veća koncentracija procijanidina B4. Svi navedeni spojevi utvrđeni su jedino u 2012. godini.

Analizom grožđa je utvrđeno da su svi spojevi koji su utvrđeni u sjemenim bobicama utvrđeni i u pasolinama. Stoga možemo pretpostaviti da je metabolizam sinteze ovih spojeva jednak i kod bobica i pasolina odnosno da metobolizam pasolina nije pod kvalitativnim utjecajem unutarnjih faktora vezanih uz nedostatak razvoja sjemenke.

Statističkom analizom podataka na prosjeku godina možemo zaključiti da je meso malih, besjemenih bobica tj. pasolina bogatije kaftarinskom i kafeinskom kiselinom te katehinom od mesa velikih, sjemenih bobica. Daljnom analizom vina, navedena statistička razlika potvrđena je u korist pasolina samo za kafeinsku kiselinu dok kod ostalih spojeva statističke razlike nisu utvrđene. Iz navedenoga proizlazi da se razlike u koncentraciji pojedinih spojeva vidljivih u grožđu ne uočavaju i u vinu. Uzroci nekonzistentnosti između odnosa u koncentracijama pojedinih spojeva između grožđa i vina mogu se pripisati utjecaju fermentacije ili uslijed premale količine i broja uzorka grožđa koji je korišten u analizi.

6.3.2 Kemijski sastav mošta i vina i organoleptičko ocjenjivanje vina

6.3.2.1 *Kemijski sastav mošta*

Analizom varijance za šećer, kiseline i pH vrijednost utvrđene su signifikantne razlike s obzirom na promatranu godinu, vrstu bobica te interakciju godine i bobica. Razlika između godina se svakako može pripisati utjecaju klimatskih prilika tijekom pojedine godine. Također, signifikantna razlika za kategoriju „vrsta bobica“ potvrđuje činjenicu da postoji razlika i između sjemenih bobica i pasolina. Pritome je signifikantna razlika (u obje godine te prosjeku godina) utvrđena za sadržaj kiselina, te vrijednost pH. Kod kiselosti, signifikantno najviša koncentracija utvrđena je u korist pasolina, dok je značajno najviša vrijednost pH dobivena kod sjemenih bobica. Ovaj rezultat je logičan, jer s porastom kiselosti pada i pH (Jackson, 2008), a u suglasju su i s ranijim istraživanjima (Preiner i sur,2012).

Kod sadržaja šećera signifikantna razlika utvrđena je jedino u 2012. godini u korist sjemenih bobica. U prosjeku godina također nije utvrđena signifikantna razlika iako je prosječno više šećera utvrđeno kod sjemenih bobica. Sadržaj šećera u 2013. godini (92,25 ^{0}Oe sjemene bobice i 86,65 ^{0}Oe pasoline) bio je značajno niži u odnosu na 2012. (73,44 ^{0}Oe sjemene bobice i 74,33 ^{0}Oe pasoline) što se može pripisati utjecaju klimatskih prilika.

Iz navedenoga se može zaključiti da se parametri kvalitete značajno razlikuju između dva promatrana tipa bobica, ali da ovise i o klimatskim prilikama.

Analizom korelacijskog odnosa (Tablica 18.) između sadržaja sjemenih bobica i kemijskih pokazatelja kvalitete mošta može se zaključiti da povećanje broja sjemenih bobica u grozdu pozitivno utječe na sadržaj šećera i vrijednost pH a negativno na sadržaj kiselina. Odnosno, što je veći sadržaj sjemenih bobica u grozdu će biti više šećera a manje kiselina odnosno viši pH.

Ove rezultate možemo interpretirati kao dokaz da stupanj oplodnje u značajnoj mjeri utječe na koncentraciju šećera, kiselina i vrijednost pH u oba tipa bobica, a time i na ukupnu kakvoću.

6.3.2.2 *Kemijska analiza i organoleptičko ocjenjivanje vina*

Kemijskom analizom vina na osnovi prosjeka godina nije utvrđena bitna razlika u pokazateljima koji su direktno vezani za kvalitetu sirovine kao što je udio alkohola (vol.%),

ekstrakt bez šećera, sadržaj nehlapivih kiselina, pH i sadržaj pepela. Signifikantna razlika na razini pojedinih godina kao i prosjeka utvrđena je jedino u sadržaju pepela. Pri tome je najveći sadržaj pepela utvrđen kod varijante P20, odnosno one sa većim udjelom sjemenih bobica, kako u prosjeku godina tako i u pojedinačnim godinama. Pretpostavka za veći sadržaj pepela kod varijante P20 može se interpretirati time što sjemene bobice posjeduju veći volumen u koji asimilacijom veće količine vode i hranjivih tvari može može doći i do većega nakupljanja mineralnih tvari koje primarno čine sadržaj pepela.

Kako je analizom mošta utvrđena povezanost sadržaja šećera i ukupne kiselosti sa udjelom pojedinih bobica pri čemu je utvrđeno da pasoline sadrže veće koncentracije kiselina, a sjemene bobice veći sadržaj šećera, interesantno je te rezultate usporediti sa dobivenim rezultatima u vinu. Varijanta P20, vinificirana iz grozdava sa većim udjelom sjemenih bobica, bi iz ranije dokazanih činjenica trebala uslijed višeg sadržaja šećera imati i viši sadržaj alkohola kao i niži sadržaj kiselina u vinu. Statističkom analizom potvrđeno je da je sadržaj alkohola bio statistički viši u 2012. godini, ali ne i u 2013. gdje je bio neznatno niži (ne i statistički opradan). Kod kiselina je utvrđeno da je njihov sadržaj statistički u varijanti P20 bio viši u 2012. godini dok je u 2013. godini bio statistički niži. U prosjeku godina nije bilo signifikantnih statističkih razlika ali je je utvrđen prosječno viši sadržaj alkohola te niži sadržaj kiselina kod varijante P20.

6.3.2.3 *Sadržaj polifenolnih spojeva u vinu*

Analizom polifenolnih spojeva u vinu tijekom obje godine istraživanja utvrđeni su spojevi kafeinska i kumarinska kiselina, galna kiselina, katehin, epikatehin i epikatehin-galat, rutin te resveratrol. Koncentracije navedenih spojeva bile su redom kafeinska kiselina (3,19 do 6,15 mg/l), galna kiselina (10,94 mg/l do 13,30 mg/l), katehin (13,48 mg/l i 17,44 mg/l), epikatehin (3,52 mg/l do 6,10 mg/l), rutin (3,8 mg/l do 6,46 mg/l) te resveratrol (0,32 mg/l do0,43 mg/l). Signifikantna razlika utvrđenaje je jedino kod kafeinske u korist varijante P80 odnosno varijante sa većim udjelom malih, besjemenih bobica, pasolina. Iako nije utvrđena signifikantna razlika varijanta P80 sadržavala je prosječno najviše galne kiseline te rutina. Također je znakovito da je prosječno najviše katehina i epikatehina utvrđeno u varijanti P20 odnosno sa najvećim udjelom sjemenih bobica. Navedeni rezultat možemo smatrati logičnim s obzirom da su navedeni spojevi primarno porijeklom iz sjemenki grožđa kojima varijanta P20 sadrži u većim količinama.

Kod hidroksicimetnih kiselina u 2012. godini najveće koncentracije utvrđene su za kaftarinsku kiselinu (6,84 mg/l do 17,29 mg/l) pri čemu je utvrđena i statistički signifikantna razlika u korist varijante P20 odnosno one sa većim udjelom sjemenih, velikih bobica. Iako

u 2011. godini kaftarinska kiselina nije utvrđena, s obzirom na ovako visoke koncentracije u odnosu na sve ostale spojeve iz ove grupe kao i ranije rezultate u grožđu možemo ustvrditi da se radi o najzastupljenijoj hidroksicimetnoj kiselini i vinu sorte Grk. Navedenu kiselinu kao najzastupljeniju u bijelim vinima navode i ostali autori (Kumušta, 2012; Betes-Saura, 1996, Okamura i Watanabe, 1981).

Zanimljiv je rezultat da u vinu sorte Grk nije utvrđena protokatehuinska kiselina koju većina autora navodi kao najzastupljeniju hidroksibenzojevu kiselinu (Pozo-Bayon i sur., 2003; Kumušta, 2012). Kumušta i sur. (2012) utvrdili su u bijelim vinima koncentraciju galne kiseline 2,39 mg/l a Pozo-Bayon i sur. (2003) 0,3 mg/l do 1,3 mg/l dok se u istraživanjima u ovoj disertaciji utvrđene značajno više vrijednosti od 10,94 mg/l do 13,30 mg/l.

Vrijednosti koncentracije spojeva iz grupe flavan-3-ola podudarna su s istraživanjima ostalih autora (Carndo i sur., 1999; Proestos i sur., 2005; Smith i Waters, 2012, De limai i sur., 2006.) . Zboga navedenoga nemožemo zaključiti dali vino ove sorte s obzirom na literturu posjeduje značajno veće koncentracije katehina koje bi mogle uvjetovati izraženiju gorčinu u vinu.

ZAKLJUČAK

Temeljem postavljenih ciljeva istraživanja i dobivenih rezultata mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Mikroskopskim tehnikama utvrđena je morfološki i funkcionalno pravilna građa sjemenog zametka i ženskog gametofita u sorte Grk koja je bila jednaka ostalim sortama u istraživanju (Chardonnay i Plavac mali).

2. Mikroskopskom analizom je utvrđeno da u sorte Grk ne postoji odstupanje u pojedinim fazama procesa sazrijevanja sjemenih zametka prije oplodnje kao i razvoju oplođenih sjemenih zametaka nakon oplodnje u odnosu na uspoređivane sorte Chardonnay i Plavac mali. Kod bobica kod kojih je došlo do oplodnje sjemeni zametak nastavlja pravilan razvoj te je utvrđeno postojanje srcolikog stadija embrija kao i embrija u fazi torpeda i kotiledonarnog stadija. Međutim, odstupanje postoji u procesu koji definiramo kao propadanje ili degeneraciju sjemenih zametaka nakon oplodnje. Kod sorte Grk do propadanja sjemenih zametaka dolazi nešto kasnije nego kod sorata Plavac mali i Chardonnay. Kod sjemenih bobica pojavu kasnijeg propadanja sjemenih zametaka možemo definirati kao proces stenospermokarpije dok kod pasolina gdije je izostala oplodnja ovaj proces možemo definirati kao partenokarpiju.

3. Do pojave besjemenih bobica, pasolina, dolazi uslijed spomenutih procesa partenokarpije ili stenospermokarpije. Kod izoliranih cvati gdije je spriječena stranooplodnja dolazi do razvoja isključivo malih besjemenih bobica. Razvoj besjemenih bobica prati početni razvoj sjemenog zametka dok unutar samog sjemenog zametka ne dolazi do razvoja zigote i ranih razvojnih stadija embrija. Pet dana od trenutka zrelosti za oplodnju prestaje razvoj čitavog sjemenog zametka a samim time i prestanak razvoja bobice. Biološki proces koji u ovom slučaju uzrokuje početni razvoj pravilno građenih ali neoplođenih sjemenih zametka te razvoj besjemenih bobica predstavlja partenokarpija.

   Besjemene bobice mogu nastati i iz oplođenih plodnica, ukoliko dođe do propadanja svih oplođenih sjemenih zametka u kasnijim razvojnim stadijima što pripisujemo pojavi stenospermokarpije. Propadanje sjemenog zametka posljedica je propadanja embrionske vreće i abortiranja razvijajućeg embrija.

   U određenim bobicama u kojima je zbog prisutnoti kapice na njušci tučka fizički bila nemoguća oplodnja, utvrđena je pojava zigote u fazi izduživanja bez procesa

degeneracije sinergida. Normalno građene stanice sinergide dokaz su da nije došlo do oplodnje već da je, prema tome, rast bobica posljedica partenokarpije. Međutim, pojava zigote u fazi izduživanja predstavlja mogućnost da je uslijed izostanka redukcijske diobe ženskog gametofita u ranijim fazama razvoja došlo do formiranja diploidnog ženskog gametofita. U tom slučaju, početni razvoj zigote i kasnije embrija možemo pripisati apomiksiji. Proces apomiksije dosad nije opisan kod vinove loze, pa bi ovu tezu trebalo potvrditi detaljnijim istraživanjima. Točan uzrok početnoga rasta i razvoja takovih bobica nije utvrđen međutim na temelju literaturnih podataka najvjerojatnije je potaknut djelovanjem biljnih hormona unutar biljke.

4. Proces partenokarpije kod vinove loze je rijetka pojava stoga bi dodatnim istraživanjima trebalo utvrditi uzrok ove pojave, prvenstveno kroz analizu aktivnosti pojedinih biljnih hormona u periodu cvatnje i neposredno nakon cvatnje te genetička istraživanja sa ciljem definiranja pojedinih gena odgovornih za pojavu partenokarpije. U praktičnom pogledu kod slučajeva partenokarpije kod drugih biljnih vrsta kao i stenospermokarpije kod vinove loze provode se postupci tretiranja biljnim hormonima (giberelin) pri čemu dolazi do intenzivnog rasta i razvoja besjemenih plodova tehnološki prihvatljive veličine i kvalitete. Navedene postupake tretiranja biljnim hormonima trebalo bi primijeniti i kod sorte Grk te utvrditi utjecaj na povećanje mase besjemenih bobica. Time bi se dobio jasniji uvid u sam metabolizam biljnih hormona kod ove sorte ali i utjecaj na prinos i kvalitetu mošta i vina.

5. Istraživanjem muškog gametofita je utvrđeno da postoje jasne morfološke razlike u građi peludnog zrna sorte Grk u odnosu na ostale sorte vinove loze. Najvažnija razlika je u građi peludne ovojnice (sporoderme) koja ne sadrži brazdice kao niti aperture kroz koje kliju vegetetativna te dvije spermalne jezgre. Iz toga razloga ne može doći niti do procesa klijanja peludi. Analizom makrosporogeneze utvrđeno je da se netom prije oplodnje u matriksu peludi nalaze formirane dvije spermalne te jedna vegetativna jezgra. Zaključno, pelud sorte Grk prolazi normalan proces gametogeneze međutim proces klijanja nije moguć zbog morfološke građe opne peludnog zrna.

6. Analizom fenološke kompatibilnosti potencijalnih sorata oprašivača utvrđeni su preliminarni rezultati koji upućuju na razlike u vremenu cvatnje između sorte Grk i

njegovih potencijalnih oprašivača, Plavca malog i Pošipa, pri čemu je Grk u fazu pune cvatnje ulazi ranije. Analizom klijavosti peludi utvrđena je dobra klijavost peludi sorata oprašivača međutim slabiji efekt oprašivanja navedenim sortama posljedica je razlika u vremenu cvatnje.

7. Kemijskom analizom šećera, kiselina i pH u moštu besjemenih bobica (pasolina) i sjemenih bobica utvrđena je signifikantno značajna razlika. Pri tome je u sjemenim bobicama utvrđen signifikantno viši sadržaj šećera i pH vrijednost dok je kod besjemenih bobica utvrđen signifikantno viši sadržaj kiselina. Također, analizom utjecaja udjela sjemenih bobica na parametre kvalitete mošta možemo zaključiti da sa povećanjem njihovog udjela raste koncentracija šećera u grozdu i pH vrijednost mošta, dok sadržaj kiselina u moštu značajno opada. Analizom polifenolnog sastava utvrđeno je da u pojedinim dijelovima bobice kao i vinu postoje signifikantne razlike u njihovom sadržaju. Kožice i meso besjemenih bobica kao i vino dobiveno njihovom vinifikacijom sadržavalo je signifikantno više pojedinih spojeva iz grupe hidroksicimetnih kiselina.
   Iako postoje signifikantne razlike u sadržaju šećera i kiselina u moštu te pojedinih polifenolnih spojeva u moštu i vinu kemijskom i organoleptičkom anlizom vina nije utvrđeno postojanje razlike u kvaliteti vina. Stoga se može zaključiti da udio neoplođenih bobica nema veći utjecaj na organoleptičku kvalitetu vina.

8. Prema rezultatima istraživanja kvalitete grožđa sa praktičnog aspekta možemo zaključiti da će u godinama sa slabijom oplodnjom i većim udjelom besjemenih bobica, pasolina, mošt sadržavati manje šećera i više kiselina. U južnim klimatskim područjuma (Srednja i Južna Dalmacija s otocima) u kojima se nalaze najveće površine zasađene sortom Grk ova pojava može imati pozitivan efekt. U navedenim područjima, a osobito u sušnim godinama, intenziviraju se procesi razgradnje organskih kiselina i sinteze šećera u grožđu. Vina dobivena iz mošta visokog sadržaja šećera i niskog sadržaja kiselina su neharmonična, imaju preveliki sadržaj alkohola a premali sadržaj kiselina koje vinu daju svježinu i pitkost. S toga aspekta, pojava velikoga udjela besjemenih bobica kao nositelja potencijalne kiselosti grožđa u navedenim uvjetima može imati pozitivan utjecaj na kvalitetu vina.

7 POPIS LITERATURE

1. Abreu I., Costa L., Oliveira M., Cunha M., Castro R.D. (2006). Ultra structure and germination of *Vitis vinifera* cv. 'Loureiro' pollen. Protoplasm 228: 131-135
2. Ahmedullah M. (1983). Pollen morphology of selected Vitis cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science 108: 155- 160
3. Alonso E., Estrella I., Revilla E. (1986). Presence of quercetin-3-O-glucuronoside in spanish table wines. J. Sci. Food Agric. 37: 1118–1120.
4. Andabaka Ž., (2015). Ampelografska evaluacija autohtonih dalmatinskih sorata vinove loze (vitis vinifera l.). Doktorska disertacija, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
5. Anonimus 1. (1875). Gospodarski List. Broj 22. Zagreb
6. Anonimus 2. (1897). Gospodarski List. Broj 2. Zagreb
7. Anonimus 3. (1870). Gospodarski List. Broj 32. Zagreb
8. Anonimus 4. (1887). Gospodarski list. Broj 5. Zagreb.
9. Antcliff A.J. (1967). A field trial with growth regulators on the Zante Currant (Vitis vinifera var.). Vitis 6: 14-20
10. Antcliff A.J. (1980). Inheritance of sex in Vitis. Annales de l'Amelioration des Plantes 30: 113-122
11. Asker S.E., Jerling L. (1992). Apomixis in Plants. Crc Press. Inc. Corporate Blvd., Boca Ranton, N.W. Florida
12. Barbagallo M.G., Guidoni S., Hunter J.J. (2011). Berry Size and Qualitative Characteristics of Vitis vinifera L. cv. Syrah. S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 32, No. 1,
13. Betes-Saura C., Andres-Lacueva C., Lamuela-Raventos R. M. (1996). Phenolics in white free run juices and wines from Penedes by High-performance liquid chromatography: Changes during vinification. J. Agric. Food Chem. 44: 3040–3046.
14. Bicknell R.A., Koltunow A.M. (2004). Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. Am. Soc. of Plant Biologists. Vol. 16: 228-245
15. Boehm E.W. (1960). Should you pollen spray Ohanez grapes?. J. Agricult. Sout. Aust. 64: 202-203. In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
16. Borrego J., Gallego J.F., Serrano L., Gómez J.L., Martínez I. (1990). Descripciones Ampelográficas Nacionales. Monografias de Investigacion y Experimentacion Agraria. Comunidad de Madrid, Madrid.-vascoulos

17. Boselli E., Minardi M., Giomo A., Frega N.G. (2006). Phenolic composition and quality of white d.o.c. wines from Marche (Italy). Anal. Ch. Act. 563: 93-100.
18. Bouard J. (1980). Tissus et organes de la vigne. *In* Sciences et Techniques de la Vigne. Vol. I. J.P. Ribereau-Gayon (ed.), pp. 3-130. Dunod, Paris. In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
19. Bouman F. (1984). The ovule. In: Johri BM. ed. Embryology of angiosperms. Berlin, Springer, 123–157.
20. Bourzeix M., Heredia N., Kovač, V. (1983). Richesse de différents cépages en composés phénoliques totaux et en anthocyanes. Prog. Agric. Vitic. 100: 421–428.
21. Bourzeix M., Weyland D., Heredia N. (1986). Etude des cat´echines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres d´eriv´es de la vigne. *Bull. OIV,* 669–670: 1171–1253.
22. Bronner A., Wagner R. (1997). Pollen et floraison chez Vitis vinifera L. Techniques de controle du pouvoir germinatif du pollen. Progres Agricole et Viticole 114: 130-139.
23. Buiarelli F., Coccioli F., Jasionowska R., Merolle M., Terracciano A. (2007). Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rap. Commun. Mass Spectrom., 21: 2955–2964.
24. Bulić S. (1949). Dalmatinska ampelografija. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb
25. Cabello Saez Santa Maria F., Luis Villota F., Tortosa Tortola M.E. (1994). Palynological study of the pollen grain of Vitis vinifera L. Cultivars. Some aspects of sculpturing and pollination. Vitis 33: 57-61
26. Cadot Y., Minana- Castello M.T., Chevalier M., (2006). Anatomical, histological and histochemical changes in grape seeds from Vitis vinifera L. Cv. Cabernet franc during fruit development. J. Agric. Food Chem. 54: 9206- 9215
27. Cahurel J.-Y. (1999). Effet du millerandge sur la qualite des raisins. Cas du Gamay Noir a jus blanc (Effect of millerandge on grape quality. The case of Gamay Noir with white juce). Progres Agricole et Viticole 116: 161- 162
28. Cantos E., Espın J. C., Fernandez M. J., Oliva J., Tomas-Barberan F. A. (2003). Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. J. Agric. Food Chem., 51: 1208–1214.
29. Carando S., Teissedre P., Pascual-Martinez L., Cabanis J. (1999). Levels of flavan-3-ols in French wines. J. Agric. Food Chem. 47: 4161-4166.
30. Carman, J.G. (1997). Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory and polyembryony. Biol. J.of the Linnean Society 61: 51-94

31. Carraro L., Lombardo G., Cargnello G., Gerola F.M. (1979). Studies on the embryo sac and the stigmatic receptivity of Vitis cultivars with different productivity (Picolit giallo and Verduzzo friulano). Vitis 18: 285- 290
32. Cheynier V., Ricardo Da Silva J.M. (1991). Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyl tartaric acid and grape polyphenoloxidase. J. Agric. Food Chem. 39: 1047–1049.
33. Chkhartishvili N., Vashakidaze L., Gurasasashvili V., Maghradze D. (2006). Type of pollination and indices of fruit set of some Georgian grapevine varieties. Vitis 45 (4): 153-156
34. Cholet L., Fougere- Rifot M., Bourad I. (1998). Particularites cellularies des baies millerandees de Vitis vinifera L. Var. Merlot (Cellular characteristics of medium size shot grape berries of Vitis vinifera L. Var. Merlot. J. Int. Sc. Vign. Vin. 32: 193- 201
35. Christensen C.A., King E.J., Jordan J.R., Drews G.N. (1997). Megagametogenesis in Arabidopsis wild type and the Gf mutant. Sex. Plant Rep. 10: 49-64.
36. Ciampolini F., Faleri C., Di Pietro D., Cresti M. (1996). Structural and cytochemical characteristics of the stigma and style in Vitis vinifera L. Var. Sangiovese (Vitaceae). An. Bot. 78: 759- 764
37. Considine J.A., Knox R.B. (1979). Development and hystochemistry of the pistil of the grape, Vitis vinifera. An. Bot. 43: 11- 22
38. Coombe B.G. (1959). Fruit set and development in seeded grape varieties as affected by defoliation, topping, girdling, and other treatments. Am. J. Enol. Vitic 12: 85- 100
39. Czochanska Z., Foo L.Y., Porter L.J. (1979). Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. Phytochemystry 18: 1819- 1822
40. Da Silva P. R., Bione N. C. P., Da Silva N., Pagliarini,M. S. (2001). Meiotic behavior of the Brazilian table grape cultivar Rubi (Vitis vinifera L.) with a high proportion of seedless berries. Vitis 40: 1-4
41. Dadic M., Belleau G. (1973) Polyphenols and beer flavor. Proceedings of the American Society of Brewing Chemists 4: 107-114. In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
42. De Limai M.T.R., Kelly M.Y., Cabanis M.T., Blaise A. (2006). Levels of phenolic acids, catechin and epicatechin in wines of Portugal and the Azores produced from different varieties and vintages. J. Int. Sc. Vign. Vin 40: 47-56.
43. Dochnahl, F.J. (1858). Der sichere Fürher in der Obstkunde auf botanisch-pomologischem Wege oder Systematische beschreibung aller Obstsorten. Wilhelm Schmid. Nürnberg.

44. Drews G.N., Lee D., Christensen G.A. (1998). Genetic analysis of female gametophyte development and function. Plant Cell 10: 5–17.
45. Dudan, M.J. (1898). Vina Dalmacije-Njihov sadnji i budući položaj. Vinogradarski i voćarski Viestnik. Zagreb.
46. Dvornic V., Georgescu M.A., Dvornic V. (1970). The influence of some microelements of vine pollen germination in vitro and on flower setting. Hort. Ab. 41, No. 6297, 1971 In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
47. Endress P.K. (2011). Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. An. Bot. 107: 1465- 1489
48. Endress P.K. (2006). Angiosperm floral evolution: morphological developmental framework. Adv. Bot. Res. 44: 1–61
49. Endress P.K. (2011). Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. Annals of Botany 107: 1465- 1489
50. Evans M.M.S., Grossniklaus U. (2009). The maize megagametophyte. In Handbook of Maize: Its Biology, J.L. Bennetzen and S.C. Hake, eds. (New York: Springer), pp. 79-104.
51. Gartel W. (1956). Investigations on the importance of boron for the grapevine, with special regard to fertilisation. Weinberg und Keller 3: 132- 139, 185- 192, 233- 241 In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
52. Gifford E.M., Foster A.S. (1989) Morphology and Evolution of Vascular Plants. W.H. Freeman
53. Glavina- Durdov M., (2009). Imunohistokemija u istraživanju novotvorina, interna skripta, Sveučilište u Splitu.
54. Goethe, H. (1887). Handbuch der Ampelographie. Zweite Auflage. Verlag Paul Parey. Berlin.
55. Guebailia H. A., Chira K., Richard T., Mabrouk T., Furiga A., Vitrac X., Monti J. P., Delaunay J. C., Merillon J.M. (2006). Hopeaphenol: The first resveratrol tetramer in wines from North Africa. J. Agric. Food Chem., 54: 9559–9564.
56. Jackson R.S. (2008). ‚Wine science – principles and applications, Elsevier, Canada.
57. Jean-Denis J. B., Pezet R., Tabacchi R. (2006). Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Photoionisation Mass Spectrometry. J. Chromatogr.: 263–268.

58. Karagiannis S., Economou A., Lanaridis P. (2000). Phenolic and volatile composition of wines made from *Vitis vinifera* cv. muscat lefko grapes from the Island of Samos. J. Agric. Food Chem. 48: 5369-5375.
59. Katalinić V., Smole Možina S., Skroza D., Generalić I., Abramovič H., Miloš M., Ljubenkov I., Piskernik S., Pezo I., Terpinc P., Boban M., (2010). Polyphenolic profile antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 Vitis vinifera varieties grown in Dalmatia (Croatia). Food chemistry 119: 715- 723.
60. Kennedy J.A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. Ciencia e investigacion 35(2): 107- 120.
61. Kennedy J.A., Saucier C., Glories Y. (2005). Grape and wine phenolics: hystory and perspective. Am. J. Enol. Vitic. 57(3)
62. Kimura P.H., Okamoto G., Hirano K. (1996). Effects of gibberellic acid and streptomycin on pollen germination and ovule and seed development in Muscat Bailey A. Am. J. Enol. Vitic. 47: 152- 156.
63. Kiesselbach T.A. (1949). The structure and reproduction of corn. Nebr. Agric. Exp. Stn. Ann. Rep. 161: 1-96. Reprinted 1999 by Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
64. Koltunow A.M.., Bicknell R.A., Chaudhury A.M. (1995). Apomixis: Molecular Strategies for the Generation of Genetically Identical Seeds without Fertilization. Plant Physiol. 108(4): 1345-1352.
65. Kumušta M., Pavloušek P., Kupsa J. (2012). Phenolic profile in Czech white wines from different terroirs. Food Sci. Biotechnol. 21(6): 1593- 1601
66. Lea A. G. H., Bridle P., Timberlake C.F., Singelton V.L. (1979). The procyanidins of white grapes and wines. Am. J. Enol. Vitic. 30(4)
67. Ledbeiter C.A., Burgos L., Palmquist D. (1994). Comparison of methods used for determining the stenospermic trait in *Vitis vinifera L.* Vitis 33: 11-13
68. Leljak-Levanić D., Mihaljević S., Bauer N. (2015). Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. Acta physiologiae plantarum. 37-127: 1-14
69. Linder R., Linskens H.H. (1978). Grape pollen in Alsace. In: Grapevine Genetics and Breeding, 2nd International Symposium on Vine Improvement, Bordeoux (INRA: Paris), pp. 75-79 In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
70. Lombardo G., Carraro L., Cargnello G., Bassi M. (1976). Ultrastructure of pollen of Vitis vinifera L. Cv. „Picolit giallo“ and its behaviour in experiments of self- and cross- polination. Vitis 15: 78- 81

71. Makris D.P., Kallithraka S., Mamalos A. (2006). Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents. Talanta 70: 1143-1152
72. Makris D.P., Psarra E., Kallithraka S., Kefalas, P. (2003). The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. Food Res. Int. 36: 805-814
73. Malavolta E., Vitti G.C., Oliveira S.A. (1997). Avaliacao do Estado Nutricional des Plantas. 2 ed. Rev. e atual. Piracicaba Potafos.
74. Maletić, E., Pejić, I., Karoglan Kontić, J., Piljac, J., Dangl, G.S., Vokurka, Lacombe, T., Mirošević, N., Meredith, C. (2004). Zinfandel, Dobričić, and Plavac Mali: The Genetic Relationship among Three Cultivars of the Dalmatian Coast of Croatia. Am. J. Enol. Vitic. 55: 174-180.
75. Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2008). Vinova loza- ampelografija, ekologija, oplemenjivanje. Školska knjiga, Zagreb.
76. May P., (2004). Flowering and fruitset in grapevines. Lythrum Press, Adelaide
77. Mayer G. (1964). Untersuchungen uber die Ursachen der unterschiedlichen Keimfahigkeit verschiedener Vitis sp.. Mittelungen Klosterneuburg Serie A Rebe und Wein 14: 118- 132. In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
78. Me G., Sacerdote S., Vallania R. (1984). Investigetions on meiosis in pollen mother vells of diploid and tetraploid Vitis vinifera L. Cv. Barbera. Vitis 23: 195-201
79. Meneghetti S., Gardiman M., Calo,A. (2006). Flower biology of grapevine. A review. Adv. Hortic. Sci. 20: 317-325.
80. Mirošević N., (1981). Istraživanje klijavosti peludi sorte Moslavac bijeli. Magistarski rad, Fakultet poljoprivrednih znanosti sveučilišta u Zagrebu (Agronomski fakultet sveučilišta u Zagrebu), Zagreb
81. Mirošević N., Turković Z. (2003). Ampelografski atlas. Golden marketing- Tehnička knjiga, Zagreb
82. Mirošević N., Karoglan Kontić J. (2008). Vinogradarstvo. Školska knjiga, Zagreb
83. Mirošević N. (2012). Lumbarajski Grk- od psefizme do naših dana. Nova stvarnost, Zagreb
84. Moreno- Arribas M.V., Polo M.C., (2009). Wine Chemistry and Bio chemistry, Springer Science+Bussiness Media, LLC, New York.
85. Negrul A.M. (1934). Contribution to the question of parthenocarpy and apomixis in the grape. Tt. Prikl. Bot. Genet. Selek Ser. 8(2): 229-268 In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide

86. Organisation Internationale de la vigne et du vin(O.I.V.) (1995). Review of Sensory Analysis of Wine
87. Organisation Internationale de la vigne et du vin (O. I. V.) (2007). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Vol. 1. O. I. V., Paris
88. Oberle G.D. (1938). A genetic study of variations in floral morphology and function in cultivated forms of *Vitis*. New York State Agric. Exp. Station Tech. Bulletin 250: 416-420. In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
89. Okamoto G., Fuji Y., Hirano K., Tai A., Kobayashi A. (1995). Pollen tube growth – inhibitors from Pione grape pistils. Am. J. Enol. Vitic. 46: 17- 21
90. Okamoto G., Omorin N. (1991). Effect of the levels of minerals, phytohormones and pistil extracts on in vitro ovule development and pollen-tube growth in excised grape pistils. J. Jap. Soc. Horticult. Sci. 60: 521- 529
91. Okamura S., Watanabe M. (1981). Determination of phenolic cinnamates in white wine and their effect on wine quality. Agric. Biol. Chem., 45: 2063–2070.
92. Ong B.Y., Nagel C.W. (1978). Hydroxycinnamic acid tartaric acid ester content in mature grapes and during the maturation of White Riesling grapes. Am. J. Enol. Vitic. 29: 277-281 In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
93. Patil S.G., Patil V.P., (1996). Meiotic studies in Vitis vinifera, Vitis rotundifolia and their hybrid. Nucleus 39: 140-143
94. Pearson H.M. (1993). Parthenocarpy and seed abortion in Vitis vinifera. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 29: 169-175
95. Pejić, I., Mirošević, N., Maletić, E., Piljac, J., Meredith, C. (2000). Srodnost kultivara Plavac mali crni, Primitivo crni i Zinfandel crni (Vitis vinifera L.). ACS. 65 (1): 21-25.
96. Perrone G., Nicoletti I., Pascale M., De Rossi A., De Girolamo A., Visconti A. (2007). Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. J. Agric. Food Chem. 55: 6807–6812.
97. Petter, F. (1857). Dalmatien in seinen verschidenen beziehungen. Leopold Sommer, Wien
98. Piljac, J., Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Dangl, G.S., Pejić, I., Mirošević, N., Meredith, C.P. (2002). The parentage of cv. Pošip bijeli, a major white wine cultivar of Croatia. Vitis 41 (2): 83-89
99. Portele K. (1883). Studien uber die Entwiclung der Traubenbeeren (Studies on the development of grape berries). Mittheilungen aus der landwirtchaftlichen Landes-

Ansalt San Michele (Tirol) In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide

100. Pozo-Bayón M.A., Hernández M.T., Martín-Alvarez P.J., Polo M.C. (2003). Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. J. Agric. Food Chem. 51(7): 2089-95.
101. Pratt C. (1971). Reproductive anaomy in cultivated grapes – a review. New York State Agricultural Experiment Station for publication as Journal Paper No. 1819
102. Preiner D., Karoglan-Kontic J., Simon S. (2012). Intravarietal Agronomic Variability in Croatian Native Vitis vinifera L. Cultivar Grk with Female Flower and Seedless Berries. Am. J. Enol. Vitic. 63(2): 291-295
103. Proestos C., Bakogiannis A., Psarianos C., Koutinas A.A., Kanellaki M., Komaitis, M. (2005). High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. Food Control 16: 319-323.
104. Pussa T., Floren J., Kuldepp P., Raal A. (2006). Survey of grapevine Vitis vinifera stem polyphenols by Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Tandem Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 54: 7488–7494.
105. Rabion P., Boidron J.N., Bouard J. (1986). Influence du millerandge sur la composition des mouts de Vitis vinifera L cv. Merlot (Influence of millerandge on the composition of must of Vitis vinifera L. Cv. Merlot). In: 3rd International Symposioum on Grapevine Physiology, Bordeoux. Eds J. Bouard and R. Pouget (OIV: Paris) pp. 119-124.
106. Ramchandani A.G., Raghunthan S.C., Shrirang S.P. (2010). Evaluation of antioxidant and anti- initiating activities of crude polyphenolic extracts from seedless and seeded Indian grapes. Food chem. 119: 298- 305.
107. Rentzsch M., Wilkens A., Winterhalter P. (2009). Non-flavonoid Phenolic Compounds. In: Wine Chemistry and Biochemistry. M.V. Moreno-Arribas, M. Carmen Polo (Eds). Springer Science+Business Media LLC. pp 509-528.
108. Riberau- Gayon P. (1965). Identification d´esters des acides des acides cinnamiques et l´acide tartarique dans les limbes et les baies de Vitis vinifera. Compt. Rend. 260: 341-343 In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
109. Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2000). Handbook of Enology. Volume 2: The chemistry of wine: stabilization and treatments. Chichester, John wiley & Sons Ltd

110. Ribereau- Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu, D., (2006). Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatment, 2nd Edition, John wiley & Sons Ltd.
111. Ricardo da Silva, J. M., Bourzeix, M., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1991a). Procyanidin composition of Chardonnay, Mauzac and Grenache blanc grapes. Vitis, 30, 245–252.
112. Ritter von Heintl, F. (1821). Der Weinbau des österreichischen Keiserthums. Vienna.
113. Robichaud J.L., Noble A.C. (1990). Astrigency and bitterness of selected phenolics in wine. J. Sc. Food Agri. 53(3): 343- 353
114. Rodriguez Montealegre R., Romero Peces R., Chacon Vozmediano J.L., Martinez Gascuena J., Garcia Romero E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. J. Food Comp. An. 19: 6-7
115. Romeyer F.M., Macheix J.J., Goiffon J.P., Reminiac C.C., Sapis J.C. (1983). The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxy cinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. J. Agric. Food Chem. 31: 346-349
116. Romeyer F.M., Macheix J.J., Sapis J.C. (1986). Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. Phytochemystry 25: 219- 221.
117. Sabir A. (2011). Influences of Self-and Cross- polinations on Berry Set, Seed Characteristics and Germination progress of Grape (Vitis vinifera cv. Italia). Int. J. Agric. Biol. 13(4): 591-594
118. Sartorious O. (1926). On the development and physiology of the grape flower Der Weinwissenschaft 30 In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
119. Schmidt A, Schmid M.W, Grossniklaus U. (2015). Plant germline formatuon: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction. Development 142: 229-241
120. Schmucker Th. (1935). On the effect of boricacid on plants, especially germinating pollen grains. Planta 23: 264- 283 In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide
121. Sharafi Y., Bahmani A. (2011). Pollen germination, tube growth and longevity in some cultivars of Vitis vinifera L.. Afri. J. Microb. Res. 5(9): 1102-1107

122. Singelton V.L., Draper D.E., Rossi Jr. J.A. (1966). Paper chromatography of phenolic compounds from grapes, particularly seeds, and some variety- ripeness relationships. Am. J. Enol. Vitic. 17: 206-217.
123. Singleton V.L., Noble A.C. (1976). Wine flavor and phenolic substances. In: 'Phenolic Sulfur and Nitrogen Compounds in Food Flavors'. Eds. G. Charalambous and I. Katz (ACS Washington: DC) pp. 47-70.
124. Smith, P.A., Waters, E., (2012) Identification of the major drivers of „phenolic“ taste in white wines. Final report. The Australian wine researck institute.
125. Staudt G. (1985). Flowering, pollination and fertilization in Vitis. In: 4th International Symposium on Grape Breeding, Verona. Vignevini 13. Supplement to No. 12: 265- 26
126. Staudt G., Karssrawi M. (1972). Die Meiosis von di-und tetraplodiem Vitis vinifera „Riesling“. Vitis 11: 89- 98
127. Stout A.B. (1936). Seedlessness in grapes. New York State Agricultural Experiment Station Tecnical Bulletin 238
128. Su C.T., Singelton V.L. (1969). Identification of three flavan-3- ols grapes. Phytochemistry 8: 1553-1558
129. Sundaresan V., Alandete- Saez M., (2010). Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants, Development 137: 179- 189
130. Sudharsan R.A., Seethaiah L., (1973). Karyotype analysis and meiotic studies in three varieties of grape (Vitis vinifera L.). Cytologia 38: 549- 547
131. Swain S.M., Muller A. (2003): Plant hormones in relation to „hen and chicken“ disorder. Australian and new Zealand Grapegrower and Winemaker 474: 38-39
132. Šimon, S., Preiner, D., Maletić, E., Pejić, I. (2006). Genetic similarity among Croatian and Greek grapevine cultivars assessed by SSRs. In 9th International Conference on Grape Genetics and Breeding. Peterlunger, E. i Di Gaspero, G. (ur.). Udine
133. Trummer, F. (1841). Sistematische Clasification und Beschreibung de rim Herzogthume Steiermark vorkommenden Rebensorten. Graz.
134. Vasconcelos M.C., Greven M., Winefield C.S., Trought M.C.T., Raw V. (2009). The flowering process of Vitis vinifera. A review: Am. J. Enol. Vitic. 60(4)
135. Vilanova M., Santalla M., Masa A. (2009). Environmental and genetic variation of phenolic compounds in grapes (Vitis vinifera) from northwest Spain. J. Agric. Sci. 147: 683-697
136. Wagner E. (1962). Collecting Vitis- Pollen for crossing. I. Efect of forcing grapevines. Vitis 3: 117- 129 In: Flowering and fruitset in grapevines (May P.). Lythrum Press, Adelaide

137. Walbot V., Evans M.M. (2003). Unique features of the plant life cycle and their consequences. Nat. Rev. Genet. 4(5): 369-379
138. Wang S. P., Liu X.Y., Okamoto G. (1996). Improved berry set, ovule development and pollen tube penetration in Kyoho grapevines in Ningxia. J. Jap. Soc. Horticult. Sci. (65): 27-32.
139. Weaver R.J., McCune S.B. (1960). Further studies with gibberellin on Vitis vinifera grapes. Botanical Gazette 121: 155-0162
140. Žulj M. (2010). Analiza oplodnje sorte vinove loze Grk klasičnim metodama i DNA markerima. Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb
141. http://www.apprrr.hr/vinogradarski-registar-1128.aspx
142. www.biolegend.com/dapi-4%276-diamidino-2-phenylindole-dilactate
143. www.dojindo.com, cell staining protocol
144. http://enoviti-hanumangirl.blogspot.hr/2012/03/perilous-journey-to-fruitset.html
145. www.molecularinfo.com/MTM/J/J2/J2-1/J2-1-2.html
146. Državni hidrometeorološki zavod- klimatski podaci

8 ŽIVOTOPIS

Domagoj Stupić rođen je 10.7.1984 godine u Karlovcu. Nakon završene opće gimnazije u Karlovcu, 2003. godine upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij završava 2009. godine s naslovom diplomskog rada „Biološka, agronomska i tehnološka svojstva nekih stolnih kultivara vinove loze u uvjetima zagrebačkog vinogorja“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Bernarda Kozine. Na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo, Agronomskog fakulteta Sveučiliša u Zagrebu zaposlen je kao asistent od 2010. godine.

Aktivno sudjeluje kao suradnik u izvedbi nastave na jednom modulu preddiplomskog studija: „Uvod u tehnologiju proizvodnje grožđa i vina“, te jednom modulu diplomskog studija: „Lozno rasadničarstvo“. Ima objavljena 9 rada a1 skupine, 6 objavljenih radova a2 skupine, 3 znanstvena rada u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom, 7 sažetka u zbornicima skupova.
Suradnik je nekolicine znastvenih i stručni projekata na matičnom fakultetu.

PRILOG

Popis slika:

Slika 1. Sorta Grk (Vitis vinifera L.). (autor slike: E. Maletić)

Slika 2. Građa hermafroditnog cvijeta kod vinove loze. (autor slike: D. Preiner)

Slika 3. Shematski prikaz unutrašnjosti plodnice tučka tijekom procesa oplodnje. (slika preuzeta sa: enoviti-hanumangirl.blogspot.hr).

Slika 4. Sorta Grk (Vitis vinifera L.) u vrijeme fenofaze šare. (autor slike: D. Stupić)

Slika 5. Izolirane cvati sorte Grk nakon oprašivanja sortama Plavac mali, Pošip i Chardonnay. Pokusni nasad Baštica. (autor slike: D. Stupić)

Slika 6. Stadiji razvoja plodnica sorata Grk i Chardonnay (Ch) u prva tri dana (1-3) nakon otvaranja cvijeta. (autor slike: D. Stupić)

Slika 7. Sjemeni zametak sorte Chardonnay, jedan dan nakon otvaranja cvijeta. (autor slike: D. Stupić)

Slika 8. Ženski gametofit u području mikropile sorte Chardonnay u periodu dan nakon otvaranja cvijeta. (autor slike: D. Stupić)

Slika 9: Sjemeni zametak i ženski gametofit sorte Plavac mali jedan dan nakon otvaranja cvijeta. (autor slike: D. Stupić)

Slika 10. Sjemeni zametak sorte Grk. (autor slike: D. Stupić)

Slika 11. Sjemeni zametak plodnice s kaliptrom sorte Grk. (autor slike: D. Stupić)

Slika 12. Faze embrionalnog razvitka unutar sjemenih zametaka oplođenih bobica sorte Grk. (autor slike: D. Stupić)

Slika 13. Degenerirani sjemeni zametak bobica promjera 5 mm. (autor slike: D. Stupić)

Slika 14: Embrio torpednog razvojnog stadija sorte Plavac mali razvijen unutar bonice promjera 5 mm. (autor slike: D. Leljak-Levanić)

Slika 15. Besjemena bobica (pasolina) pet dana nakon zrelosti za oplodnju. (autor slike: D. Stupić)

Slika 16. Poprečni presjek sjemene bobice sorte Grk oplođene polenom sorte Chardonnay promjera 2,7 mm unutar čije plodnice se nalazi 6 sjemenih zametaka. (autor slike: D. Stupić)

Slika 17. Sjemene bobice osam dana nakon oplodnje. (autor slike: D. Stupić)

Slika 18. Razlike u veličini bobica kod grozdova deset dana nakon oplodnje. (autor slike: D. Stupić)

Slika 19. Pasolina u periodu 15 dana nakon otvaranja cvijeta. (autor slike: D. Stupić)

Slika 20. Sjemene bobice i pasoline u fazi rasta. (autor slike: D. Stupić)

Slika 21. Bobice na grozdu kod kojih je uočeno da ne dolazi do opadanja kapice u vrijeme pune cvatnje te im je promjer veći od plodnica otvorenih cvjetova. (autor slike: D. Stupić)

Slika 22. Degeneracija sjemenih zametaka u u bobicama pokrivenim kaliptrom. (autor slike: D. Stupić)

Slika 23. Klijanje peludi sorte Chardonnay in vitro. (autor slike: D. Leljak-Levanić)

Slika 24. Peludna zrna potaknuta na klijanje in vitro sorte Chardonnay, nakon bojenja sa reagensom FDA nakon 20 minuta naklijavanja. (autor slike: D. Leljak-Levanić)

Slika 25. Dvojezgreni pelud sorte Chardonnay obojan propidij-jodidom. (autor slike: D. Leljak-Levanić)

Slika 27. Dvojezgreni pelud sorte Chardonnay obojan propidij-jodidom. (autor slike: D. Leljak-Levanić)

Slika 26. Klijanje peludi sorte Plavac mali in vitro. (autor slike: D. Leljak-Levanić)

Slika 27. Trojezgreni pelud sorte Plavac mali obojan propidij-jodidom. (autor slike: D. Leljak-Levanić)

Slika 28. Peludna zrna potaknuta na kjijanje in vitro sorte Plavac mali nakon bojenja sa reagensom FDA nakon 20 minuta naklijavanja. (autor slike: D. Leljak-Levanić)

Slika 29. Peludna zrnca sorte Grk ne pokazuju sposobnost klijanja niti nakon 20h. (autor slike: D. Leljak-Levanić)

Slika 30. Pelud sorte Grk. (autor slike: D. Leljak-Levanić)

Slika 31. Dvojezgrena i trojezgrena pelud u sorte Grk obojena propidij jodidom.
(autor slike: D. Leljak-Levanić)

Popis grafova:

Graf 1. Srednje mjesečne temperature zraka u vegetaciji,
Zemunik, 2011., 2012., 2013. god.

Graf 1. Srednje mjesečne temperature zraka u vegetaciji,
Zemunik, 2011., 2012., 2013. god.

Graf 3. Srednje dnevne temperature zraka u periodu cvatnje, Zemunik, 2012. i 2013. god.

Graf 4. Oborine u periodu cvatnje, Zemunik, 2012. i 2013. god.

Graf 5. Srednje dnevne temperature zraka u periodu cvatnje, Maksimir, 2012. i 2013. god.

Graf 6. Oborine u periodu cvatnje, Maksimir, 2012. i 2013. god.

Graf 7. Udio sjemenih zametaka u bobicama sorte Grk pri veličinama bobica
od 3-7 milimetara.

Graf 8. Udio sjemenih zametaka u bobicama sorte Plavac mali pri veličinama bobica
od 3-7 milimetara.

Graf 9. Udio sjemenih zametaka u bobicama sorte Chardonnay pri veličinama bobica
od 3-7 milimetara.

Graf 10. Udio bobica veličine 7 milimetara sa određenim brojem sjemenih zametaka.

Graf 11. Dinamika rasta sjemenih bobica i pasolina u određenom periodu nakon
zrelosti za oplodnju.

Popis tablica:

Tablica 1. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u vinima različitih sorata u različitim
klimatskim područjima

Tablica 2. Kategorije veličina plodnica

Tablica 3. Kategorije fenofaze cvatnje prema BBCH skali

Tablica 4. Sorte u fenofazi cvatnje

Tablica 5. Usporedba srednjih vrijednosti broja sjemenih bobica u grozdu ovisno o oprašivaču.

Tablica 6. Rezultat analize varijance udjela sjemenih bobica u grozdu s obzirom na korištene oprašivače u dvije godine istraživanja.

Tablica 7. Broj sjemenki u sjemenim bobicama kod različitih oprašivača*

Tablica 8. Usporedba srednjih vrijednostiza sadržaj spojeva iz skupine fenolnih kiselina u kožici bobici

Tablica 9. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva iz skupine flavan-3-ola u kožici bobice

Tablica 10. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva iz skupine flavonola te resveratrola u kožici bobice

Tablica 11. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj spojeva iz skupine procijanidina u kožicama bobice u 2012 godini

Tablica 12. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva iz skupine hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina u mesu bobice

Tablica 13. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva iz skupine flavan-3-ola u mesu bobice

Tablica 14. Usporedba srednjih vrijednosti signifikantnosti za sadržaj pojedinih spojeva iz skupine flavonola te resveratrola u mesu bobice

Tablica 15. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj spojeva iz skupine procijanidina u mesu bobica u 2012

Tablica 16. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj šećera, kiselina i pH u bobicama i pasolinama.

Tablica 17. Rezultat analize varijance za sadržaja šećera, kiselina i pH između sjemenih i nesjemenih bobica.

Tablica 18. Korelacija udjela sjemenih bobica u grozdu sa sadržajem šećera, kiselina i pH u pojedinom tipu bobica.

Tablica 19. Usporedba srednjih vrijednosti za parametre osnovne kemijske analize.

Tablica 20. Rezultati ocjenjivanja vina metodom 100 bodova

Tablica 21. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva u vinu (mg/l) iz grupe hidroksicimetnih.

Tablica 22. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva u vinu (mg/l) iz grupe hidroksibenzojevih kiselina.

Tablica 23. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva u vinu (mg/l) iz grupe flavan-3-ola.

Tablica 24. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj pojedinih spojeva u vinu (mg/l) iz grupe flavonola te resveratrola.

Tablica 25. Usporedba srednjih vrijednosti za sadržaj spojeva iz skupine procijanidina u vinu u 2012. godini