

# Utjecaj hranjive podloge na specijalizirane metabolite dviju sorti vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u uvjetima in vitro

---

Spudić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:935990>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Iva Spudić

**Utjecaj hranjive podloge na sekundarne  
metabolite dviju sorti vinove loze (*Vitis  
vinifera* L.) u uvjetima *in vitro***

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Iva Spudić

**Effect of nutrient mediums on the secondary  
metabolites of two grapevines (*Vitis vinifera*  
L.) cultivars *in vitro***

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Darka Preinera te komentorstvom prof. dr. sc. Zlatka Libera. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije (mag.educ.biol.et chem.).



# ZAHVALE

*Zahvaljujem mentorima izv. prof. dr. sc. Darku Preineru i prof. dr. sc. Zlatku Liberu na susretljivosti i smjericama prilikom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Posebno se zahvaljujem Dr. sc. Ivani Tomaz na pomoći u laboratoriju, na svemu što me naučila kao i na prijateljskoj podršci i savjetima tijekom studiranja.*

*Hvala Anji, Luciji, Marini, Petru, Snježani, Teni, Vedranu kao i ostalim prijateljima i kolegama na lijepim uspomenama i potpori u svim trenucima.*

*Hvala članovima moje obitelji na razumijevanju i strpljenju.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Utjecaj hranjive podloge na sekundarne metabolite dviju sorti vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u uvjetima *in vitro*

Iva Spudić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovoga rada bio je uzgojiti dvije sorte vinove loze 'Portan' i 'Graševinu' u uvjetima *in vitro* na dvije različite hranjive podloge, uobičajenoj podlozi koja sadrži Murashige i Skoog medij te podlozi koja osim navedenog medija sadrži i usporivač rasta, alar B9. Biljke uzgojene u uvjetima usporenoga rasta bile su manje u vidu kraćih stabljika i manjih dimenzija listova u odnosu na biljke uzgojene na uobičajenoj podlozi. Istražen je utjecaj različitih podloga na sastav i sadržaj pojedinačnih polifenolnih te hlapljivih organskih spojeva u listovima navedenih sorti. Veće vrijednosti masenih udjela gotovo svih analiziranih polifenolnih spojeva dobivene su u uzorcima listova biljaka uzgojenih na uobičajenoj podlozi, dok su gotovo svi pojedinačni hlapljivi spojevi bez obzira u koju kemijsku skupinu pripadaju (terpenoide, kiseline, aldehide, ketone i alkohole) imali veće apsolutne površine pikova u uvjetima usporenog rasta. Dobiveni rezultati potvrđuju da uporaba hranjive podloge za usporeni rast nema negativan utjecaj na biljku čime je utvrđena prikladnost njene uporabe za potrebe čuvanja genetskog materijala vinove loze u uvjetima *in vitro*, a čime se smanjuje učestalost subkultivacije biljaka.

Ključne riječi: 'Portan', 'Graševina', polifenolni spojevi, hlapljivi spojevi  
(50 stranica, 18 slika, 8 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Darko Preiner  
Komentor: prof. dr. sc. Zlatko Liber

Ocjenitelji:  
Prof. dr. sc. Zlatko Liber  
Doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić  
Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Rad prihvaćen: 08.09.2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

# Effect of nutrient medium on the secondary metabolites of two grapevines (*Vitis vinifera* L.) cultivars *in vitro*

Iva Spudić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The aim of this work was to grow two grape varieties 'Portan' and 'Graševina' under *in vitro* conditions on two different nutrient media, the usual medium containing Murashige and Skoog medium and the medium containing, in addition to the mentioned medium, a growth retarder, alar B9. Plants grown under conditions of slow growth were smaller in terms of shorter stems and smaller leaf sizes compared to plants grown on the usual substrate. The influence of different nutrient media on the composition and content of individual polyphenolic and volatile organic compounds in the leaves of the mentioned varieties was tested. Higher values of content of almost all analyzed polyphenolic compounds were obtained in leaf samples of plants grown on the usual substrate, while almost all individual volatile compounds, regardless of which chemical group they belong to (terpenoids, acids, aldehydes, ketones, and alcohols), had greater responses in the slow growth conditions. The obtained results confirm that the use of nutrient medium for slow growth does not have a negative effect on the plant, which established the suitability of its use for the purposes of preserving the genetic material of the grapevine *in vitro*, which reduces the frequency of subcultivation of plants.

Keywords: 'Graševina', 'Portan', polyphenolic compounds, volatile organic compounds  
(50 pages, 18 figures, 8 tables, 46 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

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

Co-supervisor: prof. dr. sc. Zlatko Liber

Reviewers:

Prof. Zlatko Liber

Asst. Prof. Mirela Sertić Perić

Assoc. Prof. Vesna Petrović Peroković

Thesis accepted: 08.09.2022.





# Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Vinova loza.....	1
1.2. Sorte vinove loze .....	3
1.2.1. 'Portan'.....	3
1.2.2. 'Graševina' .....	4
1.3. Kolekcije sorata .....	4
1.4. Tehnike <i>in vitro</i> kulture tkiva .....	5
1.5. Morfologija i anatomija lista vinove loze.....	7
1.6. Kemijski sastav lista vinove loze.....	8
1.6.1. Fenoli .....	9
1.6. 2. Hlapljivi spojevi.....	13
<b>2. Cilj istraživanja .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Materijal i metode .....</b>	<b>17</b>
3.1. Uzorkovanje i unos biljnog materijala.....	17
3.2. Priprava hranjivih podloga .....	18
3.3. Uvjeti uzgoja u klima komori.....	19
3.4. Priprava biljnog materijala za potrebe kemijskih analiza.....	19
3.5. Analiza ukupnih klorofila i karotenoida .....	20
3.6. Analiza fenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.....	21
3.7. Analiza hlapljivih spojeva primjenom vezanog sustava plinska kromatografija – spektrometrija masa.....	22
3.8. Statistička obrada podataka .....	23
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>24</b>
4.1. Utjecaj hranjive podloge na preživljavanje biljaka u uvjetima <i>in vitro</i> .....	24
4.2. Rezultati analize ukupnih klorofila i karotenoida.....	25
4.3. Rezultati analize fenolnih spojeva.....	26
4.3.1. Analiza fenolnih spojeva u listovima sorte 'Portan'.....	27
4.3.2. Analiza fenolnih spojeva u listovima sorte 'Graševina' .....	29

4.3.3. Analiza PCA .....	31
4.4. Rezultati analize hlapljivih spojeva .....	32
4.4.1. Analiza hlapljivih spojeva u listovima sorte 'Portan' .....	32
4.4.2. Analiza hlapljivih spojeva u listovima sorte 'Graševina' .....	35
4.4.3. Analiza PCA .....	38
<b>5. Rasprava .....</b>	<b>39</b>
<b>6. Zaključak .....</b>	<b>44</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>45</b>
<b>8. Životopis .....</b>	<b>50</b>

## Popis kratica

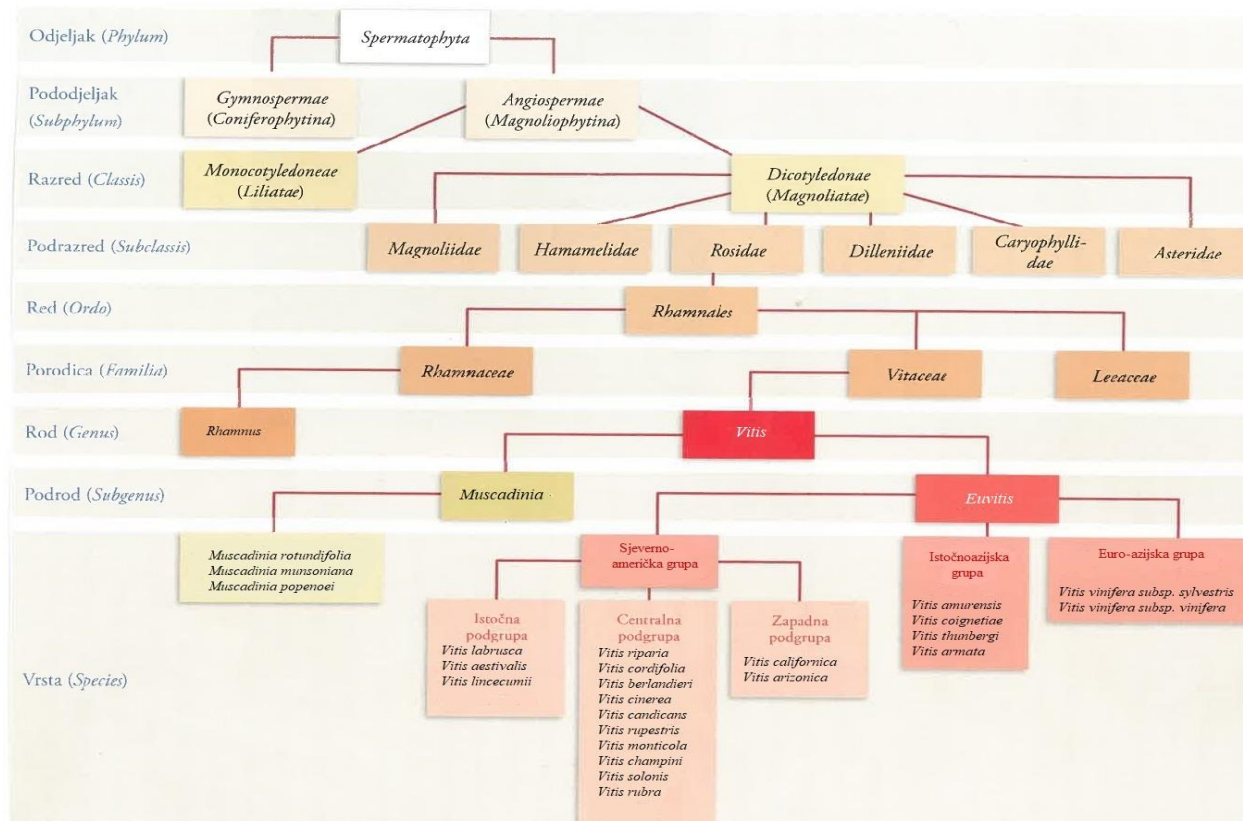
APP	apsolutna površina pikova
BLAST	engl. <i>Basic Local Aligment Search Tool</i>
Car	karotenoidi
CAR-PDMS-DVB	engl. <i>Carboxen-polydimethylsiloxane-divinylbenzene</i> , karboksen-polidimetilsiloksan-divinilbenzen
Chl a	klorofil a
Chl b	klorofil b
DMAP	dimetilalil difosfat
DAD	engl. <i>Diode array detector</i> , detektor s nizom dioda
F3H	flavanon-3-hidroksilaza
FLD	engl. <i>Fluorescence detector</i> , fluorescencijski detektor
FLS	flavonol sintaza
GC-MS	engl. <i>Gas Chromatography-Mass spectrometer</i> , plinska kromatografija-spektrometrija masa
HPLC	engl. <i>High performance liquid chromatography</i> , tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HS-SPME	engl. <i>Headspace</i> , ekstrakcija analita iznad para uzorka
INRA	fr. <i>Institut national de la Recherche Agronomique</i> , francuski Nacionalni Institut za agronomska istraživanja
IPP	izopentil pirofosfat
LDOX	leukoantocijanidin dioksigenaza
MEP	put metileritritol pirofosfata
MS-medij	Murashige i Skoog medij
MVA	mevalonatni put
OIV	fr. <i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i> , Međunarodna organizacija za lozu i vino
PCA	engl. <i>Principal component analysis</i>
PTFE	politetrafluoretilen
SG	engl. <i>Slow grow</i> , hranjiva podloga za usporeni rast
SPE	engl. <i>Solid Phase Extraction</i> , ekstrakcija čvrsto tekuće spektrometrija masa
SPMA	engl. <i>Solid Phase Microextraction Arrow</i> , mikroekstrakcija na čvrstoj fazi
UV-B	engl. <i>Ultraviolet radiation</i> , ultraljubičasto zračenje
UV-VID	ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija

# 1. Uvod

## 1.1. Vinova loza

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je biljka iz porodice lozica (*Vitaceae*) te je jedna od najznačajnijih poljoprivrednih kultura u svijetu, a razvila se na području Europe i zapadne Azije. Gospodarski je važna zbog plodova koji se koriste u ljudskoj prehrani kao svježe voće ili za preradu u vino, za izradu slastica ili drugih prehrambenih proizvoda, kao i za farmaceutske svrhe.

Lozice su višegodišnje drvenaste ili zeljaste povijuše, najčešće penjačice čija je najznačajnija karakteristika prisutnost vitica. Rod *Vitis* najvažniji je rod iz porodice *Vitaceae*, broji 70 vrsta i čine ga dva podroda *Muscadinia* i *Euvitis*. Ova se dva podroda razlikuju u broju i nepodudarnosti kromosoma (*Muscadinia*,  $2n=40$ ; *Euvitis*,  $2n=38$ ). Ostale razlike čine neka anatomski i morfološki obilježja. Za vinogradarstvo su najvažnije vrste iz podroda *Euvitis*, odnosno prave loze koje se nalaze u područjima sa umjerenom klimom. Pripadajuće vrste podroda *Euvitis* mogu se podijeliti na sjevernoameričke vrste, istočnoazijske vrste i euroazijske vrste (Slika 1) (Maletić i sur., 2008).



**Slika 1.** Sistematika roda *Vitis* i vinove loze (Maletić i sur., 2008).

Smatra se da je predak vinove loze divlja euroazijska loza, *Vitis sylvestris* ili šumska loza, koja je u vrijeme pliocena bila rasprostranjena na području Europe, od Atlantskog oceana do Crnog i Kaspijskog mora. S obzirom na arheološke i paleobotaničke dokaze smatra se da su se predstavnici rodova *Cissites* i *Paleovitis* koji se smatraju i precima porodice *Vitaceae* pojavili u vrijeme donje krede. Kao dokaz da je vinova loza na području Hrvatske prisutna od toga razdoblja svjedoči fosil lista vrste *Vitis teutonica* pronađen u Hrvatskom zagorju u okolici Radoboja. Vinova loza ubraja se među prve domesticirane voćne vrste, a nemoguće je točno utvrditi kada je započela domestikacija vinove loze s obzirom da je to vrlo rasprostranjena biljna vrsta. Na području Transkavkazije tj. uz istočne obale Crnog mora nađeni su najstariji dokazi koji potječu iz razdoblja neolitika (6000 do 5000 g.pr.Kr.). Danas je uzgoj vinove loze prisutan gotovo na svim kontinentima smještenim unutar umjerenog klimatskog pojasa (Maletić i sur., 2008, Maletić i sur., 2015).

## 1.2. Sorte vinove loze

Sorte vinove loze koje se uzgajaju danas uglavnom su nastale spontanom križanjem, ali ima i onih stvorenih ljudskim utjecajem, oplemenjivanjem. Događaj koji je obilježio razvoj vinogradarstva sredinom 19. st. bila je pojava američkih bolesti i štetnika od kojih je potrebno spomenuti trsnu uš, filokseru (*Daktulosphaira vitifoliae*, Fitch) te dvije gljivične bolesti, pepelnicu (*Uncinula necator*, Burr.) i plamenjaču (*Plasmopara viticola*, Berl. & De Toni). Upravo zbog navedenog, cilj oplemenjivanja je stvoriti tolerantnost na bolesti i štetnike, kemijski sastav specifične arome i dobiti sorte željene veličine ploda, boje, kao i vremena dozrijevanja (Maletić i sur., 2008).

U Hrvatskoj je u uzgoju veliki broj sorata vinove loze. Zahvaljujući geografskom položaju te utjecaju različitih naroda i kultura kroz povijest, u Hrvatskoj nalazimo, osim autohtonih i strane sorte vinove loze. Kao najzastupljenije hrvatske sorte potrebno je navesti 'Graševinu', 'Plavac mali' i 'Malvaziju istarsku' (Maletić i sur., 2008). Uzimajući u obzir sve vinogradske krajeve, u Hrvatskoj postoji 130 autohtonih sorata vinove loze. Neke su sorte u postupku revitalizacije i klonske selekcije. Najveća zapreka uspješnoj revitalizaciji je nedostatak certificiranog bez virusnog sadnog materijala. Neka su istraživanja pokazala da je u populaciji hrvatskih autohtonih sorata prisutna visoka razina zaraze virusima vinove loze koja uzrokuju smanjenje uroda u količini i kakvoći te utječu na eksploatacijski vijek samih nasada (Karoglan Kontić i sur., 2009). Zbog raširenosti i zastupljenosti u kontinentalnim vinogorjima zanimljiva za znanstvena istraživanja je ranije spomenuta 'Graševina' dok se za potrebe znanstvenih istraživanja u uvjetima *in vitro* obično koristi sorta 'Portan'.

### 1.2.1. 'Portan'

'Portan' je sorta vinove loze nastala križanjem sorata 'Grenache crni' i 'Blauer Portugieser' ('Portugizac') 1958. u francuskom Nacionalnom institutu za agronomska istraživanja (fr. Institut national de la Recherche Agronomique – INRA). Ovo je crna sorta vinove loze, a cilj križanja bio je dobiti sortu prikladnu za hladnija područja uzgoja koja dozrijeva ranije u odnosu na 'Grenache'. Uzgaja se u Francuskoj na području Languedocua. Kada se radi o vinima, koristi se u kupažama s

drugim crnim sortama kao što su 'Cariga' i 'Grenache'. Ova se sorta vrlo često koristi u brojnim biotehnološkim istraživanjima, a posebice u uvjetima *in vitro* (Torregrossa 2002., Torres-Vinals i sur., 2004).

### 1.2.2. 'Graševina'

'Graševina' je stara bijela sorta vinove loze, još neutvrđenog podrijetla (Slika 2). Uzgoj ove sorte najrašireniji je u srednjoj i istočnoj Europi. Gospodarski je najvažnija i najraširenija sorta vinove loze u Hrvatskoj koja pokriva oko 25% ukupnih površina pod vinogradima, premda se uzgaja samo u kontinentalnim područjima. Ova sorta nije pretjerano osjetljiva na bolesti i štetnike. Isto tako izvrsno podnosi niske zimske temperature. Vrlo je prilagodljiva i uspijeva na većini hrvatskih tala te je zadovoljavaju i klimatski uvjeti svih naših kontinentalnih vinogorja. Dozrijeva relativno kasno, krajem III. razdoblja.



**Slika 2.** Grozd 'Graševine' u fazi pune zrelosti.

### 1.3. Kolekcije sorata

Vinova loza ima veliku genetičku varijabilnost pa održavanje kolekcija genetskih resursa vinove loze u vinogradima, koje predstavljaju banke gena, zahtijevaju velika ulaganja i utrošak vremena. Potrebno je isto tako naglasiti da su genotipovi u nasadima izloženi različitim abiotskim i biotskim faktorima koji mogu imati negativan utjecaj na njihovo očuvanje. U sklopu Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na vinogradarsko-vinarskom pokušalištu 'Jazbina' postoji poljska kolekcija ili tzv. banka gena. U kolekciji se nalazi veliki broj sorata iz cijele



Hrvatske (Slika 3). Osim navedene kolekcije podignuto je još nekoliko kolekcija, u Splitu za dalmatinske sorte, za sorte Istre i Hrvatskog primorja u Poreču te za kontinentalne sorte u Hrvatskom zagorju i Osijeku (Maletić i sur., 2015).



**Slika 3.** Poljska kolekcija hrvatskih autohtonih sorata vinove loze smještena u sklopu Agronomskog fakulteta ( <https://www.agr.unizg.hr>).

Povoljniji i sigurniji način održavanja genetskih resursa za drvenaste kulture kao što je vinova loza je osnivanje repozitorija za očuvanje sorata *in vitro*. U kolekcijama sorata *in vitro* ne dolazi do gubitaka genotipova zbog utjecaja različitih abiotskih i biotskih faktora, a korištenjem novih metoda kao što je krioprezervacija troškovi se mogu smanjiti. Upravo zbog bogatstva autohtonih sorata vinove loze u Hrvatskoj kao i ostalih voćnih vrsta potrebno je poticati ovakav tip kolekcija kao i istraživanja koja se bave njihovim unapređivanjem (Maletić i sur., 2015).

#### 1.4. Tehnike *in vitro* kulture tkiva

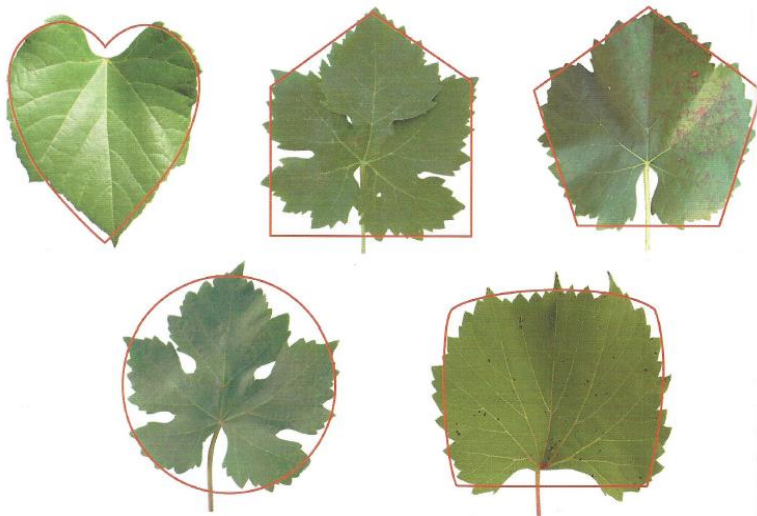
Jedan od najvažnijih ciljeva kulture tkiva jest razvoj biljaka *in vitro* u sterilnim, odnosno aseptičnim uvjetima. Metode koje obuhvaća kultura tkiva temelje se prvenstveno na totipotenti stanica što omogućuje regeneraciju cijelih biljaka iz pojedinačne stanice ili tkiva (Jelaska, 1994). Tehnike *in vitro* široko su rasprostranjene za brzo umnožavanje novih sorata i klonova, kao i za proizvodnju materijala bez patogena, a upravo je vinova loza jedna od prvih biljaka koje su uzgojene *in vitro* (Torregrosa i sur., 2001, Zok i sur., 2007). Različite tehnike kulture stanica, tkiva i organa u uvjetima *in vitro* uspješno se koriste u svrhu genetičkog poboljšanja vinove loze te očuvanja genetskih izvora vinove loze. Primjena navedenih tehnika zahtjeva česte subkultivacije biljaka te promjenu hranjive podloge (Marković i Preiner, 2011).

Za uzgoj *in vitro* biljaka potrebna je oprema za pripremu hranidbenih podloga, oprema za sterilno rukovanje biljnim uzorcima, sušionik-sterilizator, klima komora i staklenik (Jelaska, 1994). Neke tehnike mogu biti primjenjive na velik broj biljnih vrsta, no neke su vrsno ograničene. Rast biljke u uvjetima *in vitro* ovisi o izboru tkiva na početku samog istraživanja. Na regeneraciju utječe genotip pa se tako dvosupnice bolje regeneriraju od jednosupnica. Vinova loza ima dobru sposobnost regeneracije. Za uspješan uzgoj biljaka *in vitro* važno je zdravstveno stanje i starost biljke zbog čega se kod mlađih biljaka uočava bolja sposobnost regeneracije (Pierik, 1987).

Najjednostavniji dio kulture biljnog tkiva je *in vitro* mikrorazmnožavanje u staklenim ili plastičnim prozirnim posudama. Posljednjih nekoliko godina pokazalo se da se na ovaj način može klonirati znatno veći broj biljnih vrsta nego *in vivo*. Od tehnika mikrorazmnožavanja za vinovu lozu najvažnije je mikrorazmnožavanje pojedinačnim nodijskim segmentima i metoda aksilarnog pupanja. Mikrorazmnožavanje pojedinačnim nodijskim segmentima ujedno je i najviše korištena tehnika mikrorazmnožavanja vinove loze, a odnosi se na izolaciju pupa i komadića pripadajuće stabljike. Kako bi se potaknuo razvitak izdanka pupovi u pazušcu lista kao i vršni pupovi odvajaju se od matične biljke i kultiviraju na hranidbenoj podlozi. Kod opisane tehnike mikroorazmnožavanja dodavanje citokinina nije potrebno (Jelaska, 1994). Metoda aksilarnog pupanja je najpouzdanija tehnika mikrorazmnožavanja biljnih vrsta. Prilikom ove tehnike vegetacijski vršak se izolira i inducira se rast aksilarnih pupova na podlozi sa prilično visokom koncentracijom citokinina. Visoka koncentracija ovih hormona utječe na razvitak aksilarnih pupova, a sprječava apikalnu dominaciju (Jain i Häggman, 2007). Za potrebe dobivanja zdravih biljaka primjenjuje se kultura meristema. To je tehnika koja podrazumijeva izrezivanje meristemskih vršaka, te potom njihov uzgoj na hranjivoj podlozi uz odgovarajuće uvjete. Na početku kulture meristema primjenjuje se termoterapija čime se smanjuje koncentracija virusa. Ovaj toplinski postupak ima pozitivan učinak na suzbijanje virusa i fitoplazmi u novoj jedinci. Postupak kojim se eliminiraju patogeni smrzavanjem bioloških uzoraka, najčešće tekućim dušikom pri vrlo niskim temperaturama (-196 °C) naziva se krioterapija izdanaka (Marković i Preiner, 2011).

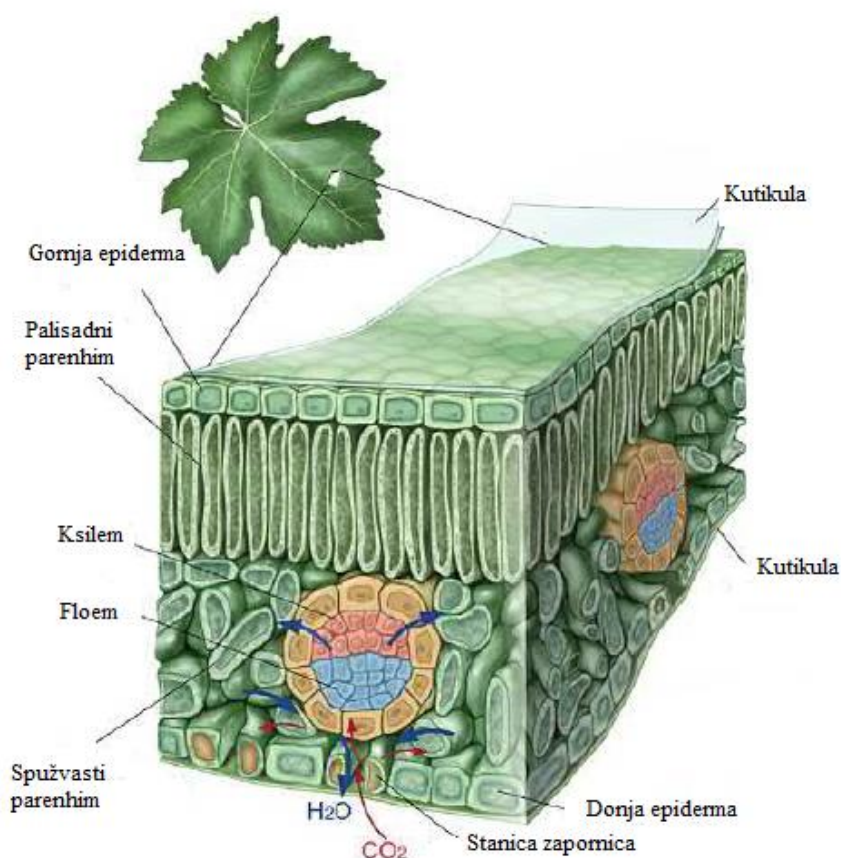
## 1.5. Morfologija i anatomija lista vinove loze

Morfološka obilježja lista vinove loze mogu se upotrijebiti za razlikovanje pojedinih sorata u sklopu ampelografskih istraživanja (Slika 4). List je vegetativni biljni organ specijaliziran za fotosintezu i transpiraciju. Sastoji se od peteljke i plojke. Peteljkom je list pričvršćen na stabljiku, a na plojci se razlikuju kako morfološki tako i anatomski strana okrenuta suncu ili lice te strana okrenuta od sunca ili naličje. Glavna funkcija lisne plojke je apsorpcija sunčeve svjetlosti u svrhu proizvodnje energije u obliku ATP-a te ugljikova dioksida u svrhu sinteze ugljikohidrata. Lice plojke lista vinove loze može biti glatko ili mješurasto naborano dok se na naličju lista nalaze dlačice. Dlačice su na žilama čekinjaste, a u intervalnim prostorima vunaste (Keller, 2020). Svojstva peteljke i plojke kao što su boja, prisutnost dlačica, debljina i dužina važna su za ampelografski opis, odnosno shemu za opis sorata vinove loze propisanu od Međunarodne organizacije za lozu i vino (fr. *Organisation Internationale de la vigne et du vin*, OIV) 1951. godine. Jednako važni za determinaciju sorata vinove loze su urezi ili sinusi koji dijele list na isječke. Sinusi ili urezi se s obzirom na mjesto na plojci dijele na gornje, donje, postrane te sinuse peteljke. Prema broju isječaka moguće je razlikovati cjelovite, trodijelne, peterodijelne, sedmerodijelne i višedijelne listove vinove loze. Prema stupnju otvorenosti sinusa peteljke razlikuju se jako otvoreni, otvoreni, slabo preklopljeni, preklopljeni i jako preklopljeni listovi (Maletić i sur., 2008).



**Slika 4.** Različiti oblici listova vinove loze: srčolik , klinast , pentagonalan, okrugao te bubrežast oblik (Maletić i sur., 2008).

Na lisnoj plojci razlikuju se gornji i donji sloj epiderme (Slika 5). Gornji sloj epiderme prekriva kutikula odnosno tanka opna. Tkivo između dva epidermalna sloja lista naziva se mezofil. On se sastoji od parenhimskih stanica gdje se razlikuje palisadni i spužvasti parenhim. Palisadni parenhim čini jedan sloj izduženih stanica te sadrži male međustanične prostore. Za razliku od palisadnog parenhima kojeg čini jedan sloj stanica, spužvasti parenhim čini 4 do 6 slojeva nepravilno oblikovanih, labavo zbijenih stanica. Zbog labavo raspoređenih stanica u spužvastom parenhimu postoji dosta međustaničnog prostora što olakšava izmjenu plinova sa okolinom. Obje vrste stanica sadrže velik broj kloroplasta koji su središta fotosinteze i asimilacije (Keller, 2020).



**Slika 5.** Poprečni presjek lista (preuzeto i prerađeno na temelju Keller 2020).

## 1.6. Kemijski sastav lista vinove loze

Sekundarni metaboliti kao što su polifenolni spojevi i hlapljivi organski spojevi vrlo su zastupljena skupina spojeva u biljkama. Raspodjela sekundarnih metabolita u biljnom svijetu je

ograničena pa mogu biti sadržani u samo jednoj biljnoj vrsti ili skupini taksonomski srodnih vrsta (Pevalek-Kozlina, 2003). Navedeni spojevi bez obzira što ne sudjeluju u primarnom metabolizmu i nisu nužni za život stanice imaju vrlo važnu ulogu u obrani biljke od abiotskih i biotskih učinaka pa time i značajno utječu na rast i razvoj biljke (Pagare i sur., 2015).

### 1.6.1. Fenoli

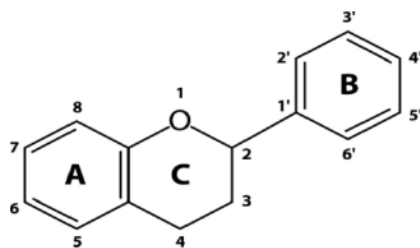
Prema definiciji Quideau i sur. (2011), a koja je danas općeprihvaćena, biljni fenoli i „polifenoli su prirodni sekundarni metaboliti koji potječu iz šikimat/fenilpropanskog biosintetskog puta i/ili poliketid-acetat/malonatnog biosintetskog puta uz nastanak monomernih ili polimernih oblika“. U skladu sa ovom definicijom, stilbeni i flavonoidi su polifenoli, a fenolne kiseline se ne ubrajaju u polifenole. S obzirom na navedeno u nastavku će se za fenolne kiseline, stilbene i flavonoide koristiti pojam fenoli ili fenolni spojevi. (Tomaz, 2016). Fenoli su heterogena skupina spojeva te su najrašireniji sekundarni metaboliti u biljnom carstvu. Najzastupljeniji su u plodovima vinove loze pa je većina dosadašnjih istraživanja fenola uglavnom bila orijentirana na njihovo istraživanje u plodovima, a tek sporadično u listovima. Znanstveno je dokazano da svakodnevno konzumiranje vina u umjerenim količinama uvelike smanjuje smrtnost od kardiovaskularnih bolesti (Maletić, 2008). Ova pojava poznata kao francuski paradoks povezana je većinom s fenolnim spojevima koji imaju antioksidacijska, antikancerogena te mnoga druga ljekovita svojstva (Šikuten i sur., 2020a). Za razliku od primarnih metabolita, fenoli nemaju ulogu u procesima disanja, fotosinteze, primanja hranjivih tvari i diferencijacije, ali su jednako važni za opstanak biljke. Kemijska osobitost fenola je hidroksilna skupina vezana na aromatski prsten (Pevalek-Kozlina, 2003).

Građa fenola je složena stoga su podijeljeni na skupine i podskupine (Tablica 1) prema broju fenolnih prstenova i strukturnim elementima koji međusobno povezuju te iste prstenove (Šikuten i sur., 2020a).

**Tablica 1.** Podjela fenola na skupine i podskupine

OSNOVNA STRUKTURA	SKUPINA
$C_6$	Jednostavni fenoli, benzokinoni
$C_6-C_1$	Hidroksibenzojeve kiseline
$C_6-C_2$	Fenilactene kiseline
$C_6-C_3$	Hidroksicimetne kiseline, fenilpropeni, kumarini, kromeni
$C_6-C_4$	Naftokinoni
$C_6-C_1-C_6$	Ksantoni
$C_6-C_2-C_6$	Stilbeni, antrakinoni
$C_6-C_3-C_6$	FLAVONOIDI: flavoni, flavonoli, flavanonoli, flavanoni, antocijanini, flavanoli (flavan-3-oli)
$(C_6-C_3)_n$	Lignini
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Kondenzirani tanini

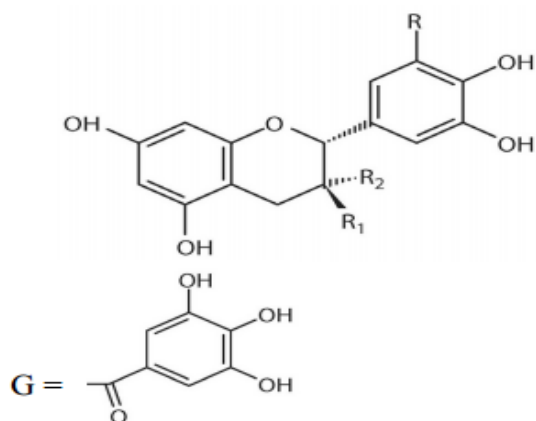
Flavonoidi čine najveću skupinu biljnih fenola koji se dijele na flavan-3-ole, flavonole, antocijane i dr. Osnovna struktura ovih (Slika 6) polifenolnih spojeva sastoji se od difenilpropanske jedinice u kojoj su dva hidroksilirana benzenska prstena povezana lancem izgrađenim od 3 atoma ugljika koji je dio heterocikličkog prstena (Tomaz, 2016).



**Slika 6.** Osnovna struktura flavonoida (Tomaz, 2016).

Flavan-3-oli (Slika 7) su bezbojni spojevi sa hidroksilnom skupinom na položaju tri prstena ugljika. Najzastupljeniji pripadnici ove skupine su katehin i epikatehin. Polimerizacijom monomernih oblika nastaju dimeri, trimeri i dr.. U vinovoj lozi zastupljeni su procijanidini tipa B koji su dimeri katehina i epikatehina (Tomaz, 2016). Ova skupina spojeva je značajna po izraženoj antioksidacijskoj aktivnosti zbog sposobnosti regulacije antioksidacijskih enzima i enzima koji

inhibiraju nastanak reaktivnih kisikovih vrsta. Isto tako ova skupina polifenola ima zaštitnu ulogu protiv mikroba, gljivica, insekata i biljoždera (Aron i sur., 2008).



(+) i (-)- Desni i lijevi izomer

(+)- Katehin: R = H; R1 = OH; R2 = H

(-)- Epikatehin: R = H; R1 = H; R2 = OH

(+)- Galokatehin: R = OH; R1 = OH; R2 = H

(-)- Epigalokatehin: R = OH; R1 = H; R2 = OH

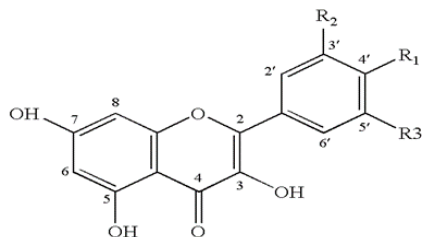
(-)- Epikatehin-3-*O*-galat: R = H; R1 = H; R2 = O-G

(+)- Galokatehin-3-*O*-galat: R = OH; R1 = H; R2 = O-G

(-)- Epigalokatehin-3-*O*-galat: R = OH; R1 = H; R2 = O-G

**Slika 7.** Struktura flavan-3-ola (Tomaz, 2016).

Flavonoli imaju oksidirani C4 atom (keto skupinu), vezanu hidroksilnu skupinu na C3 atomu te dvostruku vezu između C2 i C3 atoma (Slika 8). Najzastupljeniji predstavnici ove skupine su kvercetin, kemferol i miricetin. Najčešće se povezuju sa zaštitom biljke od UV-B zračenja, a to je prvenstveno posljedica njihovog antioksidacijskog djelovanja. Što je veća razina hidroksilacije, to je apsorpcija UV-B zračenja manja, a to je u skladu s činjenicom da dihidroksilirani flavonoli imaju veću sposobnost inhibicije nastanka reaktivnih kisikovih vrsta u odnosu na monohidroksilirane spojeve. Ova skupina spojeva sudjeluje u odgovoru biljke na visoke temperature i toksične teške metale (Šamec i sur., 2021).



Kemferol: R1 = OH; R2 = R3 = H

Kvercetin: R1 = R2 = OH; R3 = H

Miricetin: R1 = R2 = R3 = OH

Izorametin: R1 = OH; R2 = OCH3; R3 = H

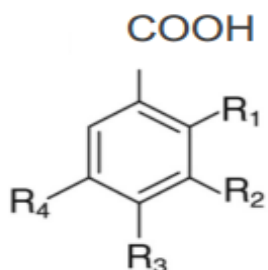
Laricitrin: R1 = OH; R2 = OCH3; R3 = OH

Siringetin: R1 = OH; R2 = R3 = OCH3

**Slika 8.** Strukturne formule aglikona flavonola (Tomaz, 2016).

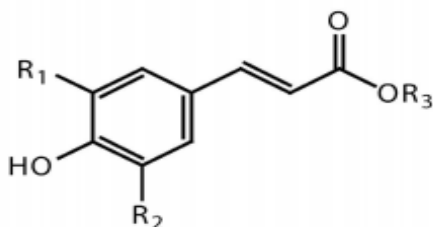
U fenolne kiseline ubrajaju se hidroksibenzojeva kiselina (Slika 9) i hidroksicimetna kiselina (Slika 10). Hidroksibenzojeva kiselina je C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> karboksilna kiselina. U vinovoj lozi su sadržane galna, gentizinska, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, prokatehinska, salicilna, vanilinska i siringinska kiselina. Sve navedene hidroksibenzojeve kiseline razlikuju se u strukturi ovisno o broju i položaju hidroksilnih i metoksilnih skupina na benzenskom prstenu (Slika 9).

Hidroksicimetna kiselina je C6-C3 karboksilna kiselina koja posjeduje dvostruku vezu na bočnom lancu te može biti u *cis* i *trans* konfiguraciji. U listovima vinove loze je pronađena znatno veći sadržaj hidroksicimetnih kiselina u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline. Kaftarinska kiselina pronađena je u najvećem sadržaju, a potom slijede kutarinska, kafeinska i ferulinska kiselina (Ivančić, 2019). Fenolne kiseline su snažni antioksidansi koji sudjeluju u inhibiciji i uklanjanju reaktivnih kisikovih vrsta. Aktivacija antioksidacijskog sustava u biljkama je posljedica poticanja fenilpropanoidnog puta biosinteze, a što uključuje i biosintezu fenolnih kiselina. Ova skupina fenola ima ulogu i u zaštiti biljke od abiotskog stresa poput visoke temperature i pesticida (Šamec i sur., 2021).



Galna kiselina: R1 = H; R2 = R3 = R4 = OH  
 Gentizinska kiselina: R1 = OH; R2 = R3 = H; R4 = OH  
*p*-Hidroksibenzojeva kiselina: R1 = R2 = H; R3 = OH; R4 = H  
 Prokatehinska kiselina: R1 = H; R2 = OCH3; R3 = R4 = OCH3  
 Salicilna kiselina: R1 = OH; R2 = R3 = R4 = H  
 Siringinska kiselina: R1 = H; R2 = OCH3; R3 = OH; R4 = OCH3  
 Vanilinska kiselina: R1 = H; R2 = OCH3; R3 = OH; R4 = H

**Slika 9.** Strukturne formule hidroksibenzojevih kiselina (Tomaz, 2016).



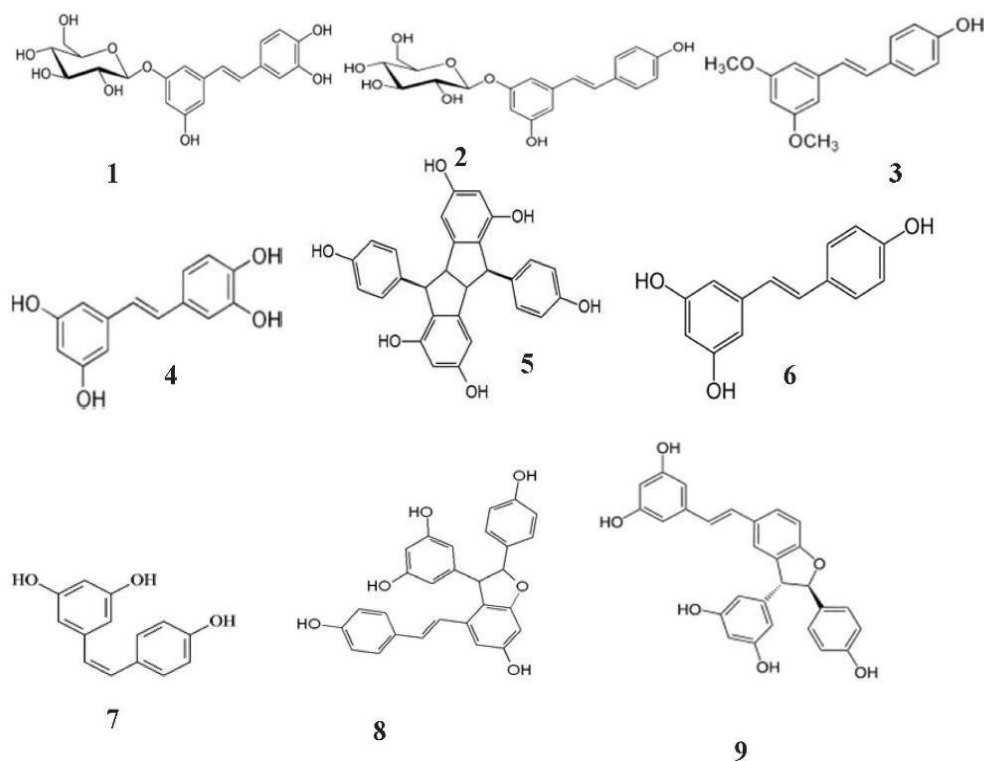
Kafeinska kiselina: R1 = OH; R2 = R3 = H  
 Kaftarinska kiselina: R1 = OH; R2 = H; R3 = C4H5O6 (tartarat)  
*p*-Kumarinska kiselina: R1 = R2 = R3 = H  
*p*-Kutarinska kiselina: R1 = OH = R2 = H; R3 = C4H5O6  
 Ferulinska kiselina: R1 = OCH3; R2 = R3 = H  
 Fertarinska kiselina: R1 = OCH3; R2 = H; R3 = C4H5O6  
 Sinapinska kiselina: R1 = R2 = OCH3; R3 = H

**Slika 10.** Strukturne formule hidroksicimetnih kiselina (Tomaz, 2016).

Stilbeni su skupina spojeva čiju osnovnu strukturu čine dva aromatska prstena povezana metilenskim mostom (Slika 11). Kako prisutnost dvostruke veze ne dozvoljava slobodnu rotaciju, moguće su dvije konfiguracije, *trans* i *cis*. U prirodi prevladava *trans* konfiguracija. U biljkama pa tako i u vinovoj lozi, osim monomernih, zastupljeni su dimerni oblici. Na osnovnu strukturu mogu biti vezane u različitom broju hidroksilne, metilne, metoksilne skupine, kao i različiti šećeri. Uloga



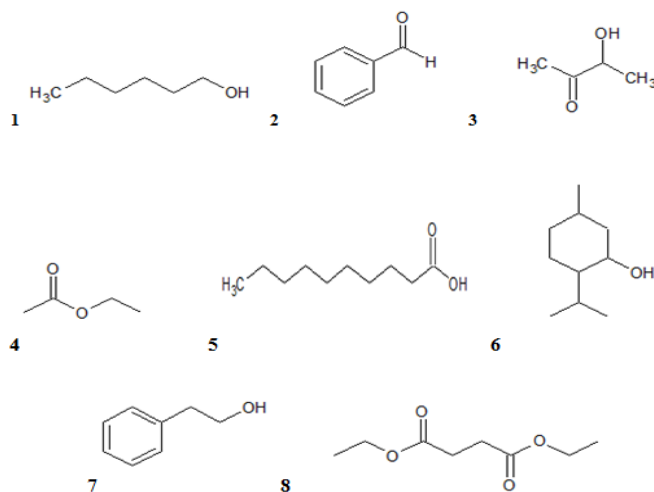
ove skupine spojeva u zaštiti od biotskog stresa dobro je poznata. Spojevi koji se ubrajaju u ovu skupinu posjeduju antimikotičko, antibakterijsko te antiviralno djelovanje. Spoj *trans*-resveratrol je najjednostavniji stilben, dok različitim modifikacijama nastaju *trans*- i *cis*-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozidi te astringin, 3'-hidroksilirani derivat *trans*-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida i pterostilben (3,5-dimetoksi-4'-hidroksistilben). Oksidacijskim povezivanjem *trans*-resveratrola i njegovih derivata nastaju dimeri, trimeri i tetrameri, kao što su  $\alpha$ -viniferin (ciklički dehidrotimer resveratrola),  $\beta$ -viniferin (ciklički dehidrotetramer resveratrola),  $\gamma$ -viniferin (oligomer resveratrola većeg stupnja polimerizacije),  $\delta$ -viniferin (izomer dehidrodimera resveratrola) te  $\varepsilon$ -viniferin (ciklički dehidrodimer resveratrola) (Tomaz, 2016., Šamec i sur., 2021).



**Slika 11.** Strukturne formule nekih stilbena: (1) *Z* i *E*-astringin, (2) *Z* i *E*-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid, (3) pterostilben, (4) astringinin, (5) palidol, (6) *trans*-resveratrol, (7) *cis*-resveratrol, (8) *Z* i *E*- $\varepsilon$ -viniferin, (9) *Z* i *E*- $\delta$ -viniferin (Tomaz, 2016).

### 1.6.2. Hlapljivi spojevi

Prema definiciji hlapljivi spojevi su spojevi koji imaju visok tlak para pri sobnoj temperaturi. Ovi spojevi su obično lipofilne tekućine s visokim tlakom para te slobodno mogu prolaziti kroz membranu te potom biti otpušteni u atmosferu ili tlo u odsutnosti difuzijske barijere (Pichersky i sur., 2006). Da bi kompenzirale svoju nepokretnost biljke su razvile različite mehanizme međudjelovanja s okolinom uključujući otpuštanje hlapljivih spojeva iz listova, cvjetova i plodova u svoju okolinu. Biljke sintetiziraju širok spektar hlapljivih organskih spojeva, a koji se prema kemijskoj klasifikaciji mogu podijeliti na alkene, aldehidi, ketoni, alkohole, estere, aromatske spojeve, masne kiseline te izoprenoide (Slika 12). Na hlapljive spojeve u biljkama otpada svega 1 % ukupnih sekundarnih metabolita (Dudareva i sur., 2004). Kemijski sastav hlapljivih spojeva može davati informacije o fiziološkom statusu biljke i stresu kojemu je ona podvrgnuta.

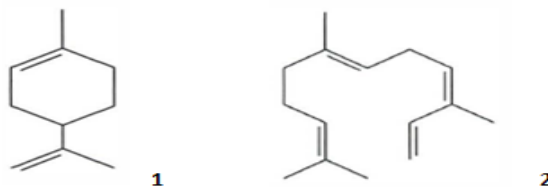


**Slika 12.** Strukture nekih hlapljivih spojeva: (1)1- heksanol, (2) benzaldehid, (3) 3-hidroksibutan-2-on, (4) etil-etanoat, (5) dekanska kiselina, (6) mentol, (7) 2-feniletanol, (8) dietil-sukcinat.

Osnovna funkcija hlapljivih spojeva je obrana biljke od štetnika i patogena ili osiguravanje razmnožavanja privlačenjem oprašivača i rasprostranjivača sjemenki. Hlapljivi spojevi iz vegetativnog tkiva kao dio obrambenog sustava biljke mogu izravno odbijati mikrobe ili životinje, ali u isto vrijeme mogu privući prirodne neprijatelje štetnika i na taj način neizravno štititi biljku

(Dudareva i sur., 2006). Sinteza hlapljivih spojeva odvija se *de novo* i to najčešće u stanicama epiderme određenog organa. Sinteza ove skupine spojeva je prostorno regulirana. Vegetativna tkiva sintetiziraju određene hlapljive spojeva najčešće kao odgovor na mehanička oštećenja ili napad patogena. Sinteza je povećana tijekom ranih faza razvoja organa te je potom relativno stalna ili se smanjuje tijekom životnog vijeka organa (Dudareva i sur., 2004).

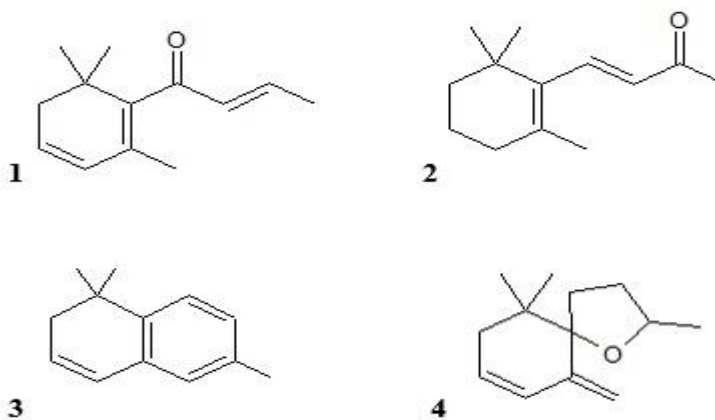
Iznimno raznolika i bogata skupina su terpeni. Oni se povezuju sa cvjetnim mirisom koji privlači odgovarajuće oprašivače, a mogu imati i antimikrobno djelovanje (Šikuten i sur., 2020b). To je skupina kemijskih spojeva koji kao osnovnu građevnu jedinicu imaju molekulu izoprena ( $C_5$ ). Oni potječu iz dva metabolička puta: mevalonatnog puta (MVA) i metileritritol-fosfatnog puta (MEP). U plodu vinove loze je najzastupljeniji metileritritol-fosfatni put. Značajnim modifikacijama kao što su ciklizacija, oksigenacija, redukcija i/ili izomerizacija naposljetku nastaju terpeni alkoholi. Prema broju ugljikovih atoma u molekuli terpeni se dijele na: hemiterpene ( $C_5$ ), monoterpene ( $C_{10}$ ), seskviterpene ( $C_{15}$ ), diterpene ( $C_{20}$ ) itd. (Slika 13) (Pevalek-Kozlina, 2003). Istraživanja su pokazala da biotski stresovi, poput napada biljojeda, induciraju emisiju hlapljivih tvari osobito iz zelenih listova vinove loze (Griesser i sur., 2015).



**Slika 13.** Strukturne formule monoterpena, seskviterpena: 1) limonen, 2)  $\alpha$ -farnezen (Wade, 2017).

Spojevi srodni terpenima su norizoprenoidi. To su spojevi koji se još nazivaju i apokarotenoidi, a nastaju razgradnjom karotenoida ( $C_{40}$ ). Mogu imati različit broj atoma ugljika (18, 15, 13, 11, 10, 9 ili 8), a u vinovoj lozi najzastupljeniji su oni s 13 atoma ugljika ( $C_{13}$ -norizoprenoidi). Ovisno o strukturi, norizoprenoidi se mogu podijeliti na megastigmane i nemegastigmane (Slika 14). Megastigmani sadrže benzenski prsten supstituiran na položajima 1, 5 i 6 te nezasićeni alifatski lanac s četiri atoma ugljika koji je vezan na položaju šest benzenskog prstena. U ovu se skupinu ubrajaju oksigenirani  $C_{13}$ -norizoprenoidi. Do oksigenacije može doći na

različitim položajima unutar molekule pa tako u slučaju  $\beta$ -damaskenona do oksigenacije dolazi na položaju C-7, a u slučaju  $\beta$ -ionona na položaju C-9 (Šikuten i sur., 2020b).



**Slika 14.** Strukturne formule nekih norizoprenoida: (1)  $\beta$ -damaskenon, (2)  $\beta$ -ionon, (3) 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen, (4) vitispiran.

Alifatski hlapljivi spojevi kao što su alkoholi, aldehidi i ketoni potječu od oksigenacije masnih kiselina ili razgradnje aminokiselina. Jedan od najbolje istraženih putova sinteze ovih spojeva je put lipoksigeneaze, a krajnji produkti su C<sub>6</sub> i C<sub>9</sub> spojevi.

## 2. Cilj istraživanja

Jedan od ciljeva ovog diplomskog rada bio je uzgojiti dvije sorte vinove loze ('Portan' i 'Graševina') na dvije različite hranjive podloge u uvjetima *in vitro*. Navedene sorte sam odabrala jer je 'Portan' uobičajena sorta na kojoj se provode pokusi u uvjetima *in vitro* dok je 'Graševina' najzastupljenija sorta u uzgoju na području Republike Hrvatske. Isto tako cilj istraživanja bio je odrediti sastav i sadržaj polifenolnih te hlapljivih organskih spojeva u listovima *in vitro* uzgojenih biljaka kao i njihova usporedba s obzirom na sortu i različite podloge. Rezultati ovog istraživanja bi trebali ukazati kolika je vrijednost uporabe hranjive podloge za usporeni rast (engl. slow grow, SG) za potrebe čuvanja genetskog materijala vinove loze u uvjetima *in vitro* te u smanjenju učestalosti subkultivacije.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Uzorkovanje i unos biljnog materijala

Uzorkovanje biljnog materijala provela sam tako da sam sa po 10 mladica sorata 'Portan' i 'Graševina' dobivenih uzgojem odrvenjelih reznica u kontroliranim uvjetima otkinula 5 do 6 cm od vrška mladice. U laboratoriju sam unesene mladice dodatno skratila na manje dijelove tako da su vršci mladica bili dužine 1 do 2 cm. Nakon toga sam provela sterilizaciju i izolaciju vršnog meristema. Sterilizaciju unesenog biljnog materijala provela sam ispiranjem mladica u trajanju od nekoliko minuta pod mlazom obične vode u svrhu uklanjanja površinskih nečistoća kao što su spore mikroorganizama i ostaci zemlje. Nakon toga, vrške mladica sam stavila u trajanju od svega nekoliko sekundi u tikvice u koje sam prethodno dodala 70 %-tnu vodenu otopinu etanola (Grammol, Zagreb, Hrvatska). Materijal sam potom vrlo brzo isprala i time uklonila etanol kako ne bi došlo do oštećenja biljnog tkiva. Kao sredstvo za sterilizaciju koristila sam 5 %-tnu vodenu otopinu natrijeva hipoklorita (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), a u koju sam dodala i 2 do 3 kapi deterdženta Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) da bih poboljšala učinak sterilizacijskog sredstva. Tikvice sa otopinom za sterilizaciju i biljnim materijalom miješala sam svakih 5 minuta te sam nakon 20 minuta tikvice unijela u laminar SB22496 (Telstar, Melburn, Australija) te biljni materijal izvadila i tri puta ga isprala sterilnom vodom. U sterilnim uvjetima u laminaru, provela sam izolaciju vršnog meristema s vegetacijskog vrška mladice. Postupak izolacije vršnih meristema provela sam pod binokularnim povećalom SZ61 (Olympus, Tokio, Japan) sa sterilnim priborom na sterilnom milimetarskom papiru. Na ovaj način pripremila sam eksplantate dužine 1 mm jer se manji meristemi teže regeneriraju. Inokulaciju meristemskih vršaka sam provela na hranjivoj podlozi pripremljenoj u staklenim epruvetama. Ukupno sam pripremila po 40 inokuliranih meristemskih vršaka za svaku sortu i za svaku hranjivu podlogu kako bih osigurala da po završetku dobijem 5 biljaka po sorti i varijanti pokusa za daljnja istraživanja te da bi odredila udio preživljavanja po svakoj hranjivoj podlozi jer je opće poznato da preživljavanje nije 100 %.

### 3.2. Priprava hranjivih podloga

U istraživanju sam koristila dvije vrste hranjivih podloga za obje ranije opisane sorte. Objе vrste hranjivih podloga koje sam koristila u istraživanju u osnovnom sastavu temelje se na Murashige i Skoog mediju (MS). Sastav mikro i makro elemenata te vitamina prikazan je u tablici (2) (Murashige i Skoog, 1962).

**Tablica 2.** Sastav i sadržaj makro i mikro elemenata te vitamina u MS mediju

Supstanca	Masena koncentracija mg/L
CoCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KI	0,83
MnSO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	16,90
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>2</sub> ×7H <sub>2</sub> O	8,60
CaCl <sub>2</sub>	332,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00
KNO <sub>3</sub>	1900,00
MnSO <sub>4</sub>	180,54
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00
Glicin	2,00
Mio-Inozitol	100,00
Nikotinska kiselina	0,50
Pirodoksin hidroklorid	0,50
Tiamin hidroklorid	0,10

Hranjivu podlogu koja se rutinski koristi u uvjetima *in vitro* uzgoja vinove loze (kontrolna podloga, K) pripremila sam tako da sam izvagala na vagi ABS-N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka) 30 g saharoze (Duchefa Biochemie, Haarlem, Nizozemska), 8 g agara (Duchefa Biochemie, Haarlem, Nizozemska), te 4,41 g MS medija u prahu (Duchefa Biochemie, Haarlem, Nizozemska). Menzurom sam dodala potrebnu količinu ultra-čiste vode i u nju dodala podlogu u prahu. Tako dobivenu smjesu stavila sam na magnetsku miješalicu RET basic (Ika, Staufen, Njemačka) dok nije došlo do potpunog otapanja. Po završetku otapanja, otopinu sam nadopunila vodom do ukupnog volumena od 1000 mL i ponovno ju vratila na magnetsku miješalicu. U

slijedećem koraku sam odredila vrijednost pH primjenom pH-metra Lab 85 (SI Analytics GmbH, Mainz, Njemačka). Prije nego sam elektrodu uronila u otopinu isprala sam ju s ultra-čistom vodom. Nakon što sam uronila elektrodu u otopinu odredila sam početnu vrijednost pH te dodatkom otopina NaOH (VWR, Beč, Austrija) i HCl (VWR, Beč, Austrija) podesila vrijednost pH na 5,8. Nakon toga sam otopinu zagrijala do 82 °C i dodala prethodno dobro promiješani agar i saharozu. Kako bi se agar i saharoza dobro otopili, otopinu sam uz miješanje zagrijavala do 95 °C i potom dodatno kuhala u trajanju od 5 minuta. Po završetku, hranjivu podlogu u staklenim epruvetama sam sterilizirala u autoklavu NC 100 (NuVe, Ankara, Turska) pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 1,2 bara u trajanju od 25 min. Po završetku sterilizacije, hranjivu podlogu sam ostavila da se ohladi.

Hranjivu podlogu za usporeni rast (engl. slow grow, SG) koja je i ranije korištena u uvjetima *in vitro* uzgoja vinove loze (Hassanen i sur., 2013) pripremila sam na isti način kao i podlogu K osim što sam dodala veću masu saharoze (35 g) i alar B9 (diaminozid) (Supelco, Darmstad, Njemačka) kao usporivač rasta u konačnoj masenoj koncentraciji od 0,4 mg/L, a što sam postigla tako da sam dodala 1 mL radne otopine alara B9 masene koncentracije 400 mg/L. Radnu otopinu alara B9 priredila sam tako da sam u odmjernu tikvicu od 100 mL dodala 40 mg alara B9 i do oznake dodala ultra-čistu vodu.

### 3.3. Uvjeti uzgoja u klima komori

Nakon inokulacije, posudice s hranjivom podlogom i biljnim materijalom odnijela sam u klima komoru Fitoclima 1200 Bio (Aralab, Rio de Mouro, Portugal) u kojoj sam ranije podesila temperaturu na stalnih  $26 \pm 2$  °C. Materijal sam smjestila pod bijelo LED svjetlo intenziteta 3000 lux-a uz fotoperiod od 12 sati svjetla i 8 sati mraka. Biljke sam redovito provjeravala te sam ih nakon 60 dana iznijela iz komore i provela uzorkovanje za potrebe daljnjih analiza.

### 3.4. Priprava biljnog materijala za potrebe kemijskih analiza

Iz matičnih biljaka uzela sam listove koje sam pomoću škara odvojila od ostatka biljke i stavila u papirnate vrećice i pohranila u zamrzivač DF 290 (NuVe, Ankara, Turska) na -80 °C.



Zamrznute listove sam potom stavila u liofilizator Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka). Liofilizacija je postupak sušenja sublimacijom koji se odvija u kontroliranim uvjetima pri niskom tlaku i temperaturi. Za potrebe primarnog sušenja podesila sam tlak liofilizatora na vrijednost od 0,1 mbara, a postupak je trajao 24 sata. Potom sam provela i sekundarno sušenje podešavanjem tlaka na 0,01 mbar, a koje je trajalo 12 sati. Liofilizirane listove biljnog materijala sam pažljivo prenijela u plastične epruvete od 50 mL te dodala kuglice za usitnjavanje. Usitnjavanje sam provela u kugličnom mlinu Mini G (SPAX SamplePrep, Metuchen, SAD) u trajanju od 2 minute uz brzinu od 1200 udaraca u minuti.

### 3.5. Analiza ukupnih klorofila i karotenoida

Postupak analize ukupnog sadržaja pigmenata u listovima vinove loze odnosno klorofila i karotenoida u svrhu utvrđivanja fotosintetske aktivnosti, provela sam u nekoliko koraka. U plastične epruvete od 5 mL odvagala sam 10 mg suhih listova te dodala 5 mL ledeno-hladnog 80 %-tnog acetona (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska). Sadržaj epruvete sam zatim snažno protresla te tako priređenu ekstrakcijsku smjesu ostavila u hladnjaku 45 minuta. Uzorke sam centrifugirala uporabom centrifuge Mega Star 600 R (VWR, Leuven, Belgija) na  $13\ 000 \times g$  20 minuta pri temperaturi od 4 °C. Po završetku centrifugiranja filtrat sam prenijela u čistu kivetu. Valne duljine na spektrofotometru Lambda XLS (Perkin Elmer, Waltham, SAD) podesila sam na 441, 646 i 663 nm. Jednako tako pripremila sam i slijepu probu dodajući u čistu kivetu samo 80%-tni aceton. Nakon opisanog postupka očitala sam apsorbancije za pojedinačne uzorke.

Na osnovu očitanih vrijednosti apsorbancija određene su koncentracije klorofila a (Chl a), klorofila b (Chl b) i karotenoida (Car) prema sljedećim jednadžbama temeljenim na radu Niuroula i sur. (2019):

$$\text{Chl a} = 12,21 \times A(663) - 2,81 \times A(646)$$

$$\text{Chl b} = 20,13 \times A(646) - 5,03 \times A(663)$$

$$\text{Car} = 4,69 \times A(441) - 0,268 \times (\text{Chl a} + \text{Chl b})$$

$$\frac{\text{mg analit}}{\text{kg suhi uzorak}} = \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{5 \text{ mL (otopina za ekstrakciju)}}{10 \times 0,1 \text{ g (masa uzorka)}}$$

### 3.6. Analiza fenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Postupak analize polifenolnih spojeva provela sam prema metodi koja se rutinski koristi za ovu vrstu analiza u Laboratoriju za grožđe, mošt i vino Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta, a temelji se na metodi opisanoj u Tomaz i sur. (2016) i Štambuk i sur., (2022a). U staklene posudice za uzorke odvagala na vagi ABS-N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka) sam 50 mg suhih listova te dodala 3 mL ekstrakcijskog otapala koje se sastojalo od 20 % acetonitrila (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska) (v/v/v), 1 % mravlje kiseline (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) (v/v/v) te 79 % vode (v/v/v). Tako priređenu ekstrakcijsku smjesu stavila sam na magnetsku miješalicu RET basic (Ika, Staufen, Njemačka) koju sam prethodno zagrijala na 48 °C. Inkubacija je trajala 2 sata i 25 minuta. Po završetku ekstrakcije, filtraciju uzoraka provela sam pomoću plastične šprice i membranskog filtra veličine pora 0,22 μm načinjenog od politetrafluoretilena (Phenomenex, Torrance, SAD) Tako pripremljene uzorke sam potom odnijela u automatski uzorkivač HPLC-sustava Agilent 1100 Series (Agilent, palo Alto, SAD). Razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva provela sam na sustavu koji se sastojao od binarne pumpe, automatskog uzorkivača, termostatiranog odjeljka za kolonu, detektora s nizom dioda te fluorescencijskog detektora. Razdvajanje analita sam provela pomoću kromatografske kolone Luna Phenyl-Hexyl (4.6 × 250 mm; 5 μm čestice (Phenomenex, Torrance, SAD)), pri temperaturi od 50 °C. Kao pokretne faze koristila sam otapalo A sačinjeno od vode i fosforne kiseline u omjeru 99,5:0,5 (v/v) i otapalo B sačinjeno od acetonitrila, vode i fosforne kiseline (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) u omjeru od 50:45,5:0,5 (v/v/v). Brzinu protoka pokretne faze podesila sam na 0,9 mL min<sup>-1</sup>. U analizi za ispiranje analita s kolone koristila sam linearni gradijent 0 min, 0 % B; 7 min, 20 % B; 35 min, 40 % B; 40 min, 40 % B; 45 min, 80 % B; 50 min, 100 % B; 60 min 0 % B. Automatski uzorkivač sam podesila tako da volumen ubrizganog uzorka bude 20 μL. Detektor s nizom dioda sam podesila tako da prikuplja podatke u rasponu valnih duljina od 200 do 700 nm, a čime sam omogućila snimanje UV-VID spektara koje ću kasnije koristiti za identifikaciju analita u ubrizganom uzorku. Hidroksibenzojeve kiseline sam detektirala pri 280 nm, stilbene pri 308 nm, hidroksicimetne kiseline pri 320 nm te flavonole pri 360 nm. Kako su flavan-3-oli prirodni fluorofori iskoristila sam to svojstvo te sam ih određivala primjenom fluorescencijskog detektora pri  $\lambda_{\text{ex}} = 225 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em}} = 320 \text{ nm}$ . Identifikaciju sam provela usporedbom vremena zadržavanja i spektara analita iz uzorka s onima ranije unesenim u bazu, a

koji su dobiveni primjenom standarada. Kvantifikaciju sam provela pomoću ranije određenih kalibracijskih pravaca dobivenih pomoću niza poznatih koncentracija standarada.

### 3.7. Analiza hlapljivih spojeva primjenom vezanog sustava plinska kromatografija – spektrometrija masa

Postupak analize hlapljivih spojeva provela sam prema metodi koja se rutinski koristi za ovu vrstu analiza u Laboratoriju za grožđe, mošt i vino Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta, a temelji se na metodi opisanoj u Šikuten i sur. (2021). Analizu hlapljivih spojeva provela sam primjenom vezanog sustava GC-MS uz prethodnu izolaciju analita primjenom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi u izvedbi klina (engl. solid phase microextraction arrow) uz karboksen – polidimetilsiloksan – divinilbenzen (engl. carboxen – polydimethylsiloxane – divinylbenzene, CAR-PDMS-DVB) (Thermo Scientific, Waltham, SAD) kao vezanu fazu pomoću automatiziranog sustava za pripremu uzoraka. Uzorke suhих listova mase 100 mg odvagala sam na vagi ABS-N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka) izravno u staklenu posudicu za uzorke volumena 15 mL. Tako pripremljene uzorke stavila sam na automatiziran sustav za pripremu uzoraka koji je dio GC-MS-a koji se sastojao od plinskog kromatograf, GC Trace 1300, povezanog sa spektrometrom masa ISQ 7000 te je bio opremljen stanicom za automatsku pripremu uzoraka TriPlus RSH (Thermo Scientific, Waltham, SAD). U posebnom računalnom programu Chromeleon (Thermo Scientific, Waltham, SAD) podesila sam parametre ekstrakcije. Temperaturu inkubacije i adsorpcije sam podesila na 60 °C, a vrijeme inkubacije i adsorpcije na 10, odnosno 46 minuta. Temperaturu desorpcije sam podesila na 250 °C, a njezino trajanje na 7 minuta. Kromatografsku analizu provela sam pomoću TR-Wax kolone dimenzija 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Thermo Scientific, Waltham, SAD) uz linearni temperaturni program u rasponu temperatura od 40 do 210 °C uz povišenje temperature od 2 °C u minuti. Snimanje spektara masa provela sam praćenjem struje svih iona u rasponu od 20 do 500  $m/z$  dok sam kao energiju elektrona odabrala energiju od 70 eV. Identifikaciju sam provela pomoću usporedbe vremena zadržavanja, retencijskih indeksa te usporedbom spektara masa s onima u NIST 17 i Wiley 12 bazi podataka.

### 3.8. Statistička obrada podataka

Rezultati analize pojedinačnih polifenolnih i hlapljivih organskih spojeva statistički su obrađeni primjenom jednosmjerne analize varijance (ANOVA) odvojeno za dvije istraživane sorte. Statističku značajnost razlika između dobivenih srednjih vrijednosti procijenjene su primjenom Tukey *post - hoc* testa na razini pouzdanosti od 95 % ( $p < 0,05$ ). Prikazani podaci u svim tablicama su prosječne vrijednosti pet opažanja. Srednje vrijednosti sadržaja polifenola i hlapljivih organskih spojeva za tretmane po sorti korištene su za analizu glavnih komponenti (engl. Principal Component Analysis, PCA). Statistička analiza provedena je primjenom računalnog programa XLSTAT (Addinsoft, 2020, New York, SAD).

## 4. Rezultati

Istraživanja su provedena na dvije sorte vinove loze 'Graševina' i 'Portan' koje su uzgojene na dvjema vrstama hranjivih podloga, uobičajenoj podlozi koja je sadržavala medij MS te na podlozi SG koja je osim medija MS sadržavala i usporivač rasta alar-9. U daljnjem tekstu koristit ću oznaku 'Portan' K za sortu 'Portan' uzgojenu na kontrolnoj podlozi, 'Portan' SG za sortu 'Portan' uzgojenu na hranjivoj podlozi za usporeni rast, Graševina K za sortu 'Graševina' uzgojenu na kontrolnoj podlozi te 'Graševina' SG za sortu 'Graševina' uzgojenu na hranjivoj podlozi za usporeni rast.

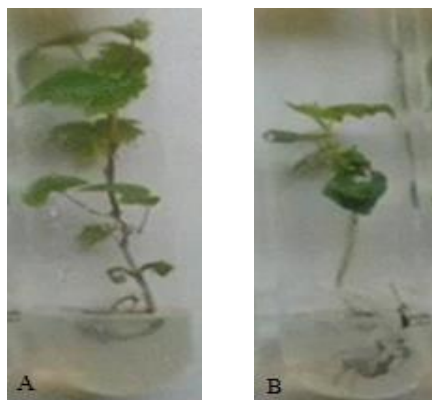
### 4.1. Utjecaj hranjive podloge na preživljavanje biljaka u uvjetima *in vitro*

U Tablici 3. navedeni su rezultati utjecaja hranjive podloge na preživljavanje biljaka pojedine sorte uzgojene u uvjetima *in vitro*. Ukupan broj meristema kod svake sorte iznosio je 20. Broj biljaka nakon 90 dana kod kontrolne varijante 'Portan' K iznosio je 17, a udio preživljavanja 85 % za razliku od varijante 'Portan' SG gdje je broj biljaka nakon 90 dana iznosio 19 sa udjelom preživljavanja 95 %. Kod kontrolne varijante 'Graševina' K broj biljaka nakon 90 dana iznosio je 18, udio preživljavanja 90 %. Kod 'Graševina' SG broj biljaka nakon 90 dana bio je 19 sa udjelom preživljavanja 95 %. Morfološke razlike analiziranih biljaka prikazane su na slikama 15. i 16. gdje se uočava slabija razvijenost biljaka (manja duljina stabljike, manji listovi) u varijantama pokusa 'Portan' SG i 'Graševina' SG.

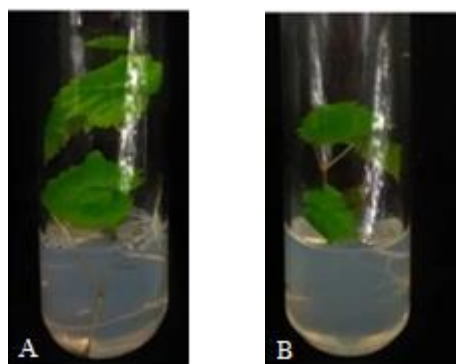
**Tablica 3.** Utjecaj hranjive podloge na preživljavanje biljaka pojedine sorte uzgojene u uvjetima *in vitro*.

	Ukupan broj meristema	Broj biljaka nakon 90 dana	Udio preživjelih biljaka / %
PORTAN K	20	17	85
PORTAN SG	20	19	95
GRAŠEVINA K	20	18	90
GRAŠEVINA SG	20	19	95

PORTAN K označava kontrolnu podlogu, a PORTAN SG podlogu za usporeni rast; GRAŠEVINA K označava kontrolnu podlogu, a GRAŠEVINA SG podlogu za usporeni rast.



**Slika 15.** (A) Kontrolna varijanta 'Portana' uzgojena u uvjetima *in vitro* na hranjivoj podlozi uobičajenog sastava, (B) Varijanta SG 'Portana' uzgojena na hranjivoj podlozi za usporeni rast.



**Slika 16.** (A) Kontrolna varijanta 'Graševine' uzgojena u uvjetima *in vitro* na hranjivoj podlozi uobičajenog sastava, (B) Varijanta SG 'Graševine' uzgojenu na hranjivoj podlozi za usporeni rast.

#### 4.2. Rezultati analize ukupnih klorofila i karotenoida

Maseni udjeli ukupnih klorofila i karotenoida određenih u listovima sorte 'Portan' i sorte 'Graševina' prikazani su u Tablici 4. Kod sorte 'Portan' u obje varijante pokusa detektirani su klorofil a, klorofil b, te karotenoidi. Veće masene udjele imali su klorofil a, klorofil b, te ukupni karotenoidi u uzorku uzgojenom na podlozi SG. U obje varijante najveći maseni udio utvrđen je kod klorofila a, slijedi ga klorofil b dok je najmanji maseni udio ukupnih karotenoida. Kod sorte 'Graševina' detektirani su klorofil a, klorofil b i karotenodi u obje varijante pokusa. Kod sorte uzgojene na podlozi SG utvrđeni su veći maseni udjeli u odnosu na sortu uzgojenu na kontrolnoj podlozi kao što je bio slučaj i kod sorte 'Portan'. Najveći maseni udio u obje varijante pokusa uočen je kod klorofila a, potom slijedi klorofil b i ukupni karotenoidi.

**Tablica 4.** Sastav i sadržaj ukupnih klorofila i karotenoida određenih u listovima sorte 'Portan' i 'Graševina'.

<b>SASTAVNICA</b>	<b>PORTAN K</b>	<b>PORTAN SG</b>
Klorofil a*	77,82 ± 3,42 <sup>b</sup>	91,10 ± 4,02 <sup>a</sup>
Klorofil b*	54,03 ± 2,46 <sup>b</sup>	65,02 ± 2,10 <sup>a</sup>
Omjer Chl a/b	1,44 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,22 <sup>a</sup>
Ukupni karotenoidi*	23,29 ± 1,45 <sup>b</sup>	29,68 ± 0,58 <sup>a</sup>
Ukupan omjer Chl/Car	5,66 ± 0,32 <sup>a</sup>	5,26 ± 0,41 <sup>a</sup>
	<b>GRAŠEVINA K</b>	<b>GRAŠEVINA SG</b>
Klorofil a*	105,85 ± 7,25 <sup>b</sup>	123,22 ± 5,16 <sup>a</sup>
Klorofil b*	70,28 ± 3,18 <sup>b</sup>	83,09 ± 5,09 <sup>a</sup>
Omjer Chl a/b	1,51 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,27 <sup>a</sup>
Ukupni karotenoidi*	29,60 ± 1,68 <sup>b</sup>	35,39 ± 0,98 <sup>a</sup>
Ukupan omjer Chl/Car	5,95 ± 0,38 <sup>a</sup>	5,83 ± 0,34 <sup>a</sup>

\* Rezultati su izraženi u mg kg<sup>-1</sup> suhih listova; PORTAN K označava kontrolnu podlogu, a PORTAN SG podlogu za usporeni rast; GRAŠEVINA K označava kontrolnu podlogu, a GRAŠEVINA SG podlogu za usporeni rast. <sup>a,b</sup> Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evin testom ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Rezultati analize fenolnih spojeva

Primjenom metode HPLC pri valnoj duljini od 360 nm detektirano je šest pojedinačnih flavonol-3-*O*-glikozida, miricetin-3-*O*-glukoronid, rutin, kvercetin-3-*O*-glukozid, kemferol-3-*O*-glukozid, kemferol-3-*O*-glukuronid te taksifolin. Ukupni maseni udio dobiven je zbrojem pojedinačnih masenih udjela svakog pojedinog spoja iz ove skupine. Ukupno je detektirano devet flavan-3-ola. Detekcija i kvantifikacija epigalokatehin-3-*O*-galat provedena je pri valnoj duljini od 280 nm, dok su ostali spojevi iz ove skupine galokatehin, epigalokatehin, katehin, epikatehin te procijanidini A1, B1, B2 i B4 detektirani i kvantificirani primjenom detektora FLD, uz valnu duljinu pobude od 225 nm i valnu duljinu emisije od 320 nm. Ukupni maseni udio dobiven je zbrojem pojedinačnih masenih udjela svakog pojedinog spoja iz ove skupine. Šest hidroksicimetnih kiselina, kaftarinska, kumarinska, kafeinska, kutarinska, fertarinska te sinapinska detektirane su i kvantificirane pri valnoj duljini od 320 nm, dok su hidroksibenzojeve kiseline, prokatehinska i siringinska, detektirane i kvantificirane pri valnoj duljini od 280 nm. Ukupni maseni udio hidroksicimetnih kiselina kao i onaj hidroksibenzojevih dobiven je zbrojem pojedinačnih masenih udjela svakog pojedinog spoja iz odgovarajuće skupine. Stilben, resveratrol-3-*O*-glukozid, detektiran je i kvantificiran pri 308 nm, eskulin koji se ubraja u hidroksikumarine

detektiran i kvantificiran pri valnoj duljini od 320 nm. Maseni udjeli su izraženi u mg kg<sup>-1</sup> suhih listova.

#### 4.3.1. Analiza fenolnih spojeva u listovima sorte 'Portan'

Maseni udjeli pojedinačnih fenolnih spojeva određenih u listovima sorte 'Portan' prikazani su u Tablici 5. U obje varijante pokusa detektirani su rutin, kvercetin-3-*O*-glukozid, kemferol-3-*O*-glukozid i kemferol-3-*O*-glukonorid. Najzastupljeniji flavanol-3-*O*-glikozid u obje varijante pokusa bio je kvercetin-3-*O*-glukozid, a slijedi ga rutin. Derivati kemferola imali su značajno manje masene udjele, dok derivat mirecetina nije bio sadržan u listovima sorte 'Portan' bez obzira na varijantu pokusa. Potrebno je istaknuti taksifolin koji je za razliku od ostalih analiziranih spojeva ima veći maseni udio u uzorku uzgojenom na podlozi SG. Zbrojem maseni udjeli pojedinih flavanol-3-*O*-glikozida dobiven je maseni udio ukupnih flavanol-3-*O*-glikozida te je on bio značajno veći u kontrolnoj varijanti. U uzorcima listova sorte 'Portan' bez obzira na varijantnu pokusa detektirano je devet flavan-3-ola. U obje varijante pokusa najveći maseni udio utvrđen je u slučaju procijanidina B1. Razdioba ostalih spojeva s obzirom na zastupljenost ovisi o varijanti pokusa, pa je tako drugi najzastupljeniji spoj u slučaju kontrolne epikatehin-3-*O*-galat, a u slučaju SG galokatehin. Ukupan maseni udio flavan-3-ola koji je dobiven zbrojem masenih udjela pojedinačnih flavan-3-ol značajno je veći u slučaju kontrolne varijante u odnosu na primjenu podloge SG. Ovo je ujedno i jedina skupina spojeva koja ima veće masene udjele u uvjetima usporenoga rasta. Općenito, hidroksicimetne su kiseline najzastupljenija skupina fenola u listovima sorte 'Portan'. Ukupno je detektirano 6 kiselina, a najzastupljenija među njima bila je kaftarinska kiselina, a slijedi ju kafeinska kiselina bez obzira na varijantu pokusa. U odnosu na ostale skupine spojeva hidroksicimetne kiseline su najmanje zastupljena skupina spojeva. Od ostalih skupina spojeva u uzorcima listova 'Portana' detektirani su eskulin te resveratrol-3-*O*-glukozid. Maseni udio eskulina statistički se značajno ne razlikuje u obje varijante pokusa, dok je maseni udio jedinog detektiranoga stilbena bio značajno veći u kontrolnoj varijanti.



**Tablica 5.** Sastav i sadržaj pojedinačnih fenola određenih u listovima sorte 'Portan'. Rezultati su izraženi u mg kg<sup>-1</sup> suhih listova.

SPOJ	PORTAN K	PORTAN SG
<b>Flavonol-3-O-glikozidi</b>		
Miricetin-3-O-glukuronid	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Rutin	257,44 ± 7,83 <sup>a</sup>	455,35 ± 11,05 <sup>a</sup>
Kvercetin-3-O-glukozid	2702,90 ± 28,19 <sup>a</sup>	865,12 ± 15,63 <sup>b</sup>
Kemferol-3-O-glukozid	128,22 ± 32,80 <sup>a</sup>	140,04 ± 0,11 <sup>a</sup>
Kemferol-3-O-glukonorid	16,38 ± 0,77 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,23 <sup>b</sup>
Taksifolin	0,00 ± 0,00	107,07 ± 1,73 <sup>a</sup>
<b>Ukupni</b>	<b>3104,93 ± 69,60<sup>a</sup></b>	<b>1571,31 ± 28,74<sup>b</sup></b>
<b>Flavan-3-oli</b>		
Epigalokatehin-3-O-galat	1753,01 ± 23,29 <sup>a</sup>	550,97 ± 23,72 <sup>b</sup>
Galokatehin	1717,78 ± 7,14 <sup>a</sup>	1030,80 ± 1,74 <sup>b</sup>
Epigalokatehin	1088,39 ± 23,62 <sup>a</sup>	790,58 ± 10,98 <sup>b</sup>
Procijanidin B1	3779,49 ± 29,92 <sup>a</sup>	2498,01 ± 38,34 <sup>b</sup>
Katehin	72,90 ± 0,79 <sup>a</sup>	53,33 ± 3,67 <sup>b</sup>
Procijanidin B4	222,19 ± 1,42 <sup>a</sup>	154,19 ± 7,41 <sup>b</sup>
Procijanidin B2	135,92 ± 2,45 <sup>a</sup>	65,65 ± 3,34 <sup>b</sup>
Epikatehin	186,96 ± 2,21 <sup>a</sup>	70,63 ± 1,99 <sup>b</sup>
Procijanidin A1	99,92 ± 0,64 <sup>b</sup>	128,75 ± 0,97 <sup>a</sup>
<b>Ukupni</b>	<b>9056,54 ± 91,51<sup>a</sup></b>	<b>5397,91 ± 24,32<sup>b</sup></b>
<b>Hidroksicimetne kiseline</b>		
Kaftarinska kiselina	7964,94 ± 255,98 <sup>a</sup>	3984,69 ± 83,46 <sup>b</sup>
Kutarinska kiselina	9,14 ± 0,37 <sup>b</sup>	26,92 ± 0,72 <sup>a</sup>
Kafeinska kiselina	1659,27 ± 11,17 <sup>a</sup>	1070,29 ± 19,04 <sup>b</sup>
Fertarinska kiselina	9,06 ± 1,02 <sup>b</sup>	40,66 ± 42,53 <sup>a</sup>
Kumarinska kiselina	45,35 ± 1,34 <sup>b</sup>	79,54 ± 1,80 <sup>a</sup>
Sinapinska kiselina	700,38 ± 12,28 <sup>a</sup>	312,68 ± 4,57 <sup>b</sup>
<b>Ukupne</b>	<b>10388,16 ± 309,47<sup>a</sup></b>	<b>5514,78 ± 162,46<sup>b</sup></b>
<b>Hidroksibenzojeve kiseline</b>		
Prokatehinska kiselina	127,86 ± 0,44 <sup>a</sup>	127,38 ± 2,61 <sup>a</sup>
Siringinska kiselina	308,83 ± 8,79 <sup>a</sup>	6,64 ± 1,00 <sup>b</sup>
<b>Ukupne</b>	<b>436,69 ± 9,23<sup>a</sup></b>	<b>134,02 ± 3,61<sup>b</sup></b>
<b>Ostali</b>		
Eskulin	554,24 ± 27,31 <sup>a</sup>	507,39 ± 10,34 <sup>a</sup>
Resveratrol-3-O-glukozid	485,24 ± 30,99 <sup>a</sup>	239,24 ± 3,53 <sup>b</sup>

PORTAN K označava kontrolnu podlogu, a PORTAN SG podlogu za usporeni rast. <sup>a,b</sup>Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-ovim testom ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2. Analiza fenolnih spojeva u listovima sorte 'Graševina'

U Tablici 6. prikazane su vrijednosti masenih udjela pojedinačnih fenolnih spojeva određenih u listovima sorte 'Graševina'. U slučaju kontrolne varijante pokusa, 'Graševina' K detektirano je 6 flavonol-3-*O*-glikozida, dok u slučaju varijante pokusa 'Graševina' SG detektirano 5 spojeva iz ove skupine flavonoida. Bez obzira na varijantu pokusa, najzastupljeniji pojedinačni spoj ove skupine bio je kvercetin-3-*O*-glukozid, a njegova vrijednost masenog udjela nije se statistički značajno razlikovala između varijanti pokusa. Ukupan maseni udio svih analiziranih flavonol-3-*O*-glikozida bio je veći u kontrolnoj varijanti u odnosu na varijantu uzgajanu u uvjetima SG, a čemu je doprinio maseni udio rutina koji nije bio sadržan u uvjetima SG. Najzastupljeniji flavan-3-ol bez obzira na varijantu pokusa bio je procijanidin B1, čiji je maseni udio bio veći u 'Graševina' K. Razdioba ostalih spojeva temeljem njihovih zastupljenosti nije jednaka za obje varijante pokusa. Drugi najzastupljeniji spoj u varijanti SG bio je epigalokatehin, a u kontrolnim uvjetima epigalokatehin-3-*O*-galat. Ukupni maseni udio ove skupine spojeva bio je značajno veći u kontrolnim uvjetima. Gledano s obzirom na ukupni maseni udio skupine, hidroksicimetne kiseline čine drugu najzastupljeniju skupinu fenolnih spojeva u uzorcima listova 'Graševine' bez obzira na varijantu pokusa uz kaftarinsku kiselinu kao najzastupljeniju kiselinu. Maseni udio ove kiseline bio je statistički značajno veći u slučaju 'Graševina' SG, dok u slučaju masenog udijela kafeinske kiseline u obje varijante nije bilo statistički značajnih razlika. Od hidroksibenzojevih kiselina u obje varijante detektirana je bila samo prokatehinska kiselina, čiji je maseni udio bio veći u kontrolnoj varijanti. Detektirani su još i eskulin i resveratrol-3-*O*-glukozid čiji su maseni udjeli bili veći u kontrolnoj varijanti pokusa.

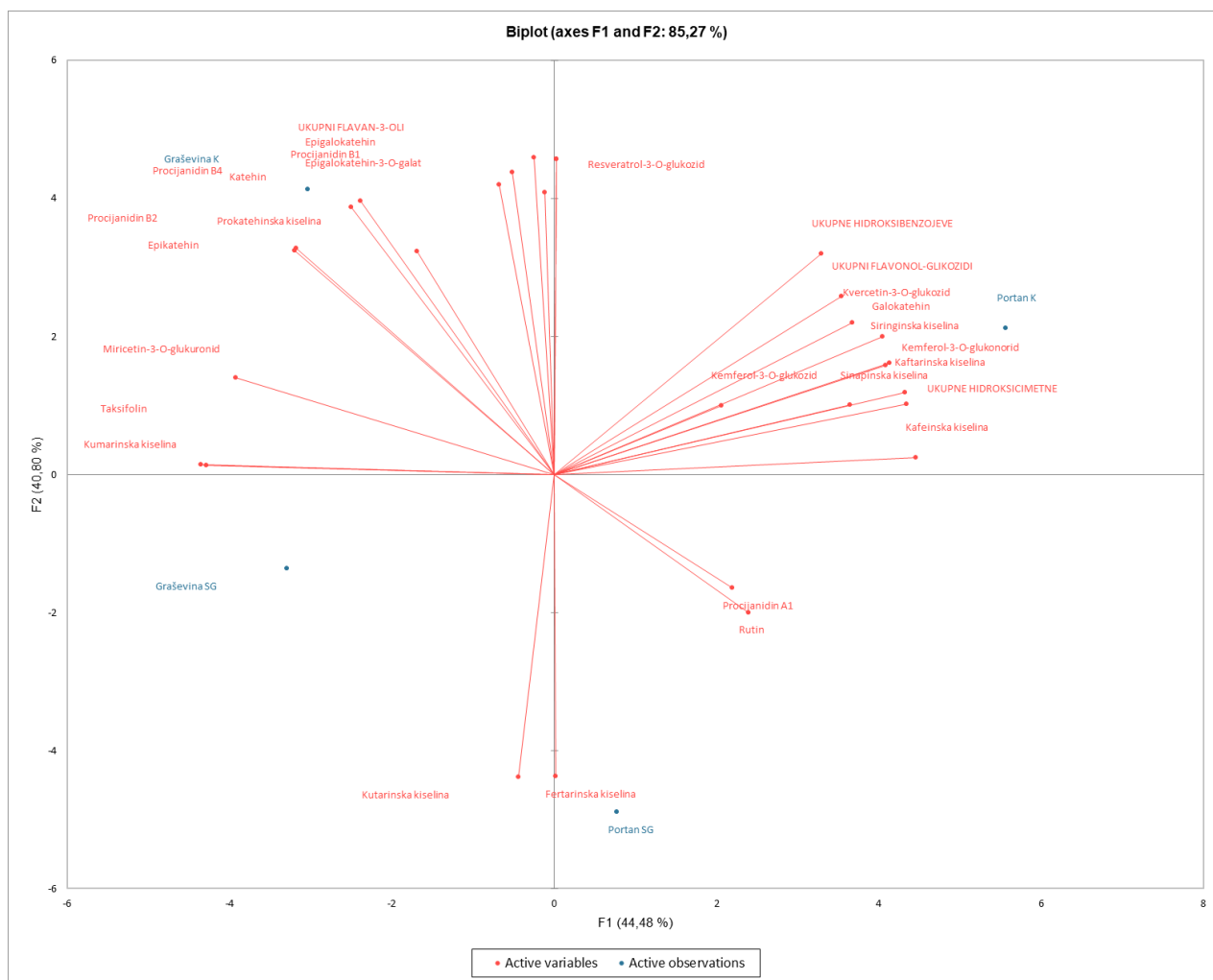
**Tablica 6.** Sastav i sadržaj pojedinačnih fenola određenih u listovima sorte 'Graševina'. Rezultati su izraženi u mg kg<sup>-1</sup> suhih listova.

SPOJ	GRAŠEVINA K	GRAŠEVINA SG
<b>Flavonol-3-O-glikozidi</b>		
Miricetin-3-O-glukuronid	223,65 ± 9,22 <sup>b</sup>	286,82 ± 0,27 <sup>a</sup>
Rutin	175,02 ± 10,03 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00
Kvercetin-3-O-glukozid	1140,95 ± 26,45 <sup>a</sup>	1132,79 ± 17,64 <sup>a</sup>
Kemferol-3-O-glukozid	141,83 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00
Kemferol-3-O-glukonorid	3,36 ± 0,68 <sup>a</sup>	2,58 ± 0,33 <sup>a</sup>
Taksifolin	256,90 ± 9,81 <sup>b</sup>	354,34 ± 12,59 <sup>a</sup>
<b>Ukupni</b>	1941,71 ± 56,41 <sup>a</sup>	1776,53 ± 30,83 <sup>b</sup>
<b>Flavan-3-oli</b>		
Epigalokatehin-3-O-galat	3224,88 ± 77,63 <sup>a</sup>	346,88 ± 8,08 <sup>b</sup>
Galokatehin	1087,46 ± 12,79 <sup>a</sup>	726,49 ± 49,82 <sup>b</sup>
Epigalokatehin	1345,42 ± 16,32 <sup>a</sup>	893,71 ± 36,35 <sup>b</sup>
Procijanidin B1	3952,44 ± 25,43 <sup>a</sup>	3701,26 ± 137,94 <sup>a</sup>
Katehin	103,09 ± 2,12 <sup>a</sup>	84,39 ± 5,03 <sup>b</sup>
Procijanidin B4	321,85 ± 3,94 <sup>a</sup>	254,05 ± 11,09 <sup>b</sup>
Procijanidin B2	347,99 ± 4,04 <sup>a</sup>	261,16 ± 6,12 <sup>b</sup>
Epikatehin	515,21 ± 6,71 <sup>a</sup>	389,01 ± 10,61 <sup>b</sup>
Procijanidin A1	93,72 ± 6,35 <sup>a</sup>	61,66 ± 1,01 <sup>b</sup>
<b>Ukupni</b>	10992,04 ± 155,34 <sup>a</sup>	6718,58 ± 249,88 <sup>b</sup>
<b>Hidroksicimetine kiseline</b>		
Kaftarinska kiselina	2929,56 ± 37,72 <sup>b</sup>	3279,02 ± 102,81 <sup>a</sup>
Kutarinska kiselina	26,72 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00
Kafeinska kiselina	806,09 ± 9,12 <sup>a</sup>	742,80 ± 24,71 <sup>a</sup>
Fertarinska kiselina	16,82 ± 0,45 <sup>a</sup>	8,48 ± 0,21 <sup>b</sup>
Kumarinska kiselina	91,24 ± 0,74 <sup>b</sup>	103,15 ± 2,30 <sup>a</sup>
Sinapinska kiselina	414,36 ± 5,00 <sup>a</sup>	266,66 ± 8,35 <sup>b</sup>
<b>Ukupne</b>	5077,92 ± 75,58 <sup>a</sup>	4746,51 ± 151,64 <sup>b</sup>
<b>Hidroksibenzojeve kiseline</b>		
Prokatehinska kiselina	104,54 ± 0,18 <sup>b</sup>	268,62 ± 6,00 <sup>a</sup>
Siringinska kiselina	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Ukupne</b>	104,54 ± 0,18 <sup>b</sup>	268,62 ± 6,00 <sup>a</sup>
<b>Ostali</b>		
Eskulin	793,15 ± 22,30 <sup>a</sup>	346,42 ± 13,27 <sup>b</sup>
Resveratrol-3-O-glukozid	614,03 ± 5,03 <sup>a</sup>	305,23 ± 10,48 <sup>b</sup>

GRAŠEVINA K označava kontrolnu podlogu, a GRAŠEVINA SG podlogu za usporeni rast. <sup>a,b</sup>Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.3. Analiza PCA

Rezultati analize PCA prikazani su na slici 17, a koja predstavlja odnos sorata i primijenjenih tretmana u prostoru definiranom s prva dva kanonička faktora, a koji predstavljaju 85,27 % ukupne varijabilnosti (44,48 % za F1 i 40,80 % za F2). Slika također sadrži i vektore koji objašnjavaju korelacije originalnih varijabli i kanoničkih faktora u istom prostoru. Iz navedenog prikaza položaja sorata i tretmana u prostoru kao i povezanih korelacija vrijednosti masenih udjela i kanoničkih faktora može se definirati razlike u vrijednosti masenih udjela ovisno o sorti i tretmanu.



**Slika 17.** Prikaz analize PCA pojedinačnih fenola koja predstavlja odnos sorata i primijenjenih tretmana u prostoru.

#### 4.4. Rezultati analize hlapljivih spojeva

Primjenom metode GC-MS detektirano je i kvantificirano ukupno 49 spojeva koji se mogu podijeliti na aldehide, ketone, alkohole, kiseline te terpene (monoterpene i seskviterpene). Ukupno je detektirano i kvantificirano 12 aldehida (heksanal, heptanal, *Z*-2-heksenal, *E*-2-heksenal, oktanal, nonanal, *Z,Z*-2,4-heksadienal, *E,E*-2,4-heksadienal, dekanal, benzaldehid, fenilacetaldehid, 4-etil-benzaldehid), 3 ketona (acetoin, 6-metil-5-hepten-2-on, 4-okten-3-on), 11 alkohola (*Z*-2-penten-1-ol, 1-heksanol, 3-metil-4-penten-1-ol, *E*-2-heksen-1-ol, *Z*-2-heksen-1-ol, 2-etil-1-heksanol, 2,3-butandiol, 1-oktanol, 1,3-butandiol, benzilni alkohol, fenilni alkohol), 8 kiselina (propanska, butanska, pentanska, heksanska, *2E*-2-heksenska, oktanska, nonanska i dekanska kiselina) te 15 terpena (limonen, jilangen, kopaen,  $\beta$ -bourbonen,  $\beta$ -kubeben,  $\beta$ -kariofilen,  $\gamma$ -elemen,  $\alpha$ -humulene,  $\gamma$ -murolen, germakren D,  $\delta$ -gvajen,  $\alpha$ -murolen, 3,7-dimetil-2-okten-1-ol, germakren B, nerol). Rezultati su izraženi u apsolutnim površinama pikova (APP), što je uobičajena praksa pri analizi SPME čvrstih uzoraka kada ne postoji komercijalno dostupna matrica uzorka (Šikuten i sur., 2021).

##### 4.4.1. Analiza hlapljivih spojeva u listovima sorte 'Portan'

U Tablici 7. navedene su vrijednosti analize pojedinačnih hlapljivih spojeva određenih u listovima sorte 'Portan'. Statistički značajno veća vrijednost APP uočena je za heksanal u varijanti 'Portan' SG u odnosu na varijantu 'Portan' K. Vrijednosti APP za heptanal, oktanal, nonanal, *E,E*-2,4- heksadienal, benzaldehid, fenilacetaldehid, 4-etil-benzaldehid isto tako bile su veće u slučaju 'Portan' SG. Najmanja vrijednost APP u obje varijante bila je u slučaju *E*-2-heksenal. Usporedbom vrijednosti APP za *Z*-2-heksen-1-ol uočene su statistički značajne razlike, a vrijednost APP bila je veća u slučaju varijante 'Portan' SG. Kod 'Portan' K određena je statistički značajno veća vrijednost APP za 2-etil-1-heksanol u odnosu na 'Portan' SG. Benzilni alkohol imao je najveću vrijednost APP u obje varijante. Ako se usporede vrijednosti APP ketona, najveću vrijednost imao je 6-metil-5-hept-2-on, s tim da je veća vrijednost opažena kod 'Portan' SG u odnosu na 'Portan' K. U obje varijante najmanju vrijednost APP imao je acetoin. U varijanti 'Portan' K određena je manja vrijednost APP za acetoin u odnosu na 'Portan' SG. U slučaju kiselina potrebno je istaknuti da je vrijednost APP butanske kiseline bila najveća u obje varijante. Vrijednost APP propanske bila je značajno veća u varijanti 'Portan' SG u odnosu na 'Portan' K. Isto tako, veće vrijednosti APP,

pentanske kiseline, *E*-2-Heksenske i butanske kiseline uočene su kod 'Portan' SG u odnosu na vrijednosti 'Portan' K. Dekanska kiselina nije detektirana kod 'Portan' SG niti 'Portan' K. Najmanju vrijednost APP imala je heksanska kiselina kod 'Portan' K i kod 'Portan' SG. Najveća vrijednost APP u slučaju terpena bila je za limonen u obje varijante. Statistički značajna razlika uočena je u slučaju  $\beta$ -kubebena čija je vrijednost APP bila veća kod 'Portan' SG u odnosu na onu 'Portan' K. Isto tako, uočena je veća vrijednost APP  $\delta$ -elemena kod 'Portan' SG u odnosu na 'Portan' K. U obje varijante, najmanja vrijednost APP bila je u slučaju germakren B.

**Tablica 7.** Sastav i sadržaj pojedinačnih hlapljivih spojeva određenih u listovima sorte 'Portan'. Rezultati su izraženi u apsolutnim površinama pikova.

SPOJEVI	PORTAN K	PORTAN SG
<b>Aldehidi</b>		
Heksanal	$7,84 \times 10^5 \pm 1,37 \times 10^4$ b	$2,32 \times 10^6 \pm 4,04 \times 10^4$ a
Heptanal	$3,97 \times 10^5 \pm 6,91 \times 10^3$ b	$7,17 \times 10^5 \pm 1,25 \times 10^4$ a
Z-2-Heksenal	$5,39 \times 10^3 \pm 9,39 \times 10^1$ a	$4,44 \times 10^3 \pm 7,74 \times 10^1$ b
<i>E</i> -2-Heksenal	$5,42 \times 10^7 \pm 9,45 \times 10^5$ b	$6,56 \times 10^7 \pm 1,14 \times 10^6$ a
Oktanal	$1,06 \times 10^6 \pm 1,84 \times 10^4$ b	$2,02 \times 10^6 \pm 3,52 \times 10^4$ a
Nonanal	$2,20 \times 10^6 \pm 3,83 \times 10^4$ b	$3,13 \times 10^6 \pm 5,45 \times 10^4$ a
Z,Z-2,4-Heksadienal	$2,33 \times 10^6 \pm 4,05 \times 10^4$ b	$2,93 \times 10^6 \pm 5,10 \times 10^4$ a
<i>E,E</i> -2,4-Heksadienal	$9,40 \times 10^5 \pm 1,64 \times 10^4$ b	$1,11 \times 10^6 \pm 1,93 \times 10^4$ a
Dekanal	$5,05 \times 10^4 \pm 8,79 \times 10^2$ b	$8,52 \times 10^4 \pm 1,48 \times 10^3$ a
Benzaldehid	$2,27 \times 10^6 \pm 3,95 \times 10^4$ b	$2,42 \times 10^6 \pm 4,22 \times 10^4$ a
Fenilacetaldehid	$6,20 \times 10^4 \pm 1,08 \times 10^3$ b	$7,77 \times 10^4 \pm 1,35 \times 10^3$ a
4-Etil-benzaldehid	$4,52 \times 10^5 \pm 7,86 \times 10^3$ b	$5,35 \times 10^5 \pm 9,32 \times 10^3$ a
<b>Ukupni aldehidi</b>	$6,48 \times 10^7 \pm 1,13 \times 10^6$ b	$8,09 \times 10^7 \pm 1,41 \times 10^6$ a
<b>Alkoholi</b>		
Z-2-penten-1-ol	$3,56 \times 10^5 \pm 6,20 \times 10^3$ b	$7,37 \times 10^5 \pm 1,28 \times 10^4$ a
1-Heksanol	$1,11 \times 10^6 \pm 1,93 \times 10^4$ b	$2,12 \times 10^6 \pm 3,69 \times 10^4$ a
3-Metil-4-penten-1-ol	$5,58 \times 10^6 \pm 9,73 \times 10^4$ b	$7,98 \times 10^6 \pm 1,39 \times 10^5$ a
<i>E</i> -2-heksen-1-ol	$2,47 \times 10^6 \pm 4,31 \times 10^4$ b	$3,13 \times 10^6 \pm 5,45 \times 10^4$ a
Z-2-heksen-1-ol	$8,65 \times 10^4 \pm 1,51 \times 10^3$ b	$1,01 \times 10^5 \pm 1,76 \times 10^3$ a
2-Etil-1-heksanol	$2,39 \times 10^6 \pm 4,16 \times 10^4$ a	$1,21 \times 10^5 \pm 2,11 \times 10^4$ a
2,3-Butandiol	$1,53 \times 10^5 \pm 2,67 \times 10^3$ b	$2,22 \times 10^5 \pm 3,87 \times 10^3$ a
1-Oktanol	$1,20 \times 10^5 \pm 2,08 \times 10^3$ b	$2,12 \times 10^5 \pm 3,69 \times 10^3$ a
1,3-Butandiol	$3,00 \times 10^5 \pm 5,23 \times 10^3$ b	$2,42 \times 10^5 \pm 4,22 \times 10^3$ a

PORTAN K označava kontrolnu podlogu, a PORTAN SG podlogu za usporeni rast. <sup>a,b</sup>Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 7.-nastavak** Sastav i sadržaj pojedinačnih hlapljivih spojeva određenih u listovima sorte 'Portan'. Rezultati su izraženi u apsolutnim površinama pikova.

<b>SPOJEVI</b>	<b>PORTAN K</b>	<b>PORTAN SG</b>
Benzilni alkohol	$4,75 \times 10^7 \pm 8,27 \times 10^5$ <sup>b</sup>	$5,06 \times 10^7 \pm 8,82 \times 10^5$ <sup>a</sup>
Fenilni alkohol	$1,62 \times 10^5 \pm 2,81 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$2,97 \times 10^5 \pm 2,01 \times 10^3$ <sup>a</sup>
<b>Ukupni alkoholi</b>	$6,34 \times 10^5 \pm 1,10 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$6,36 \times 10^7 \pm 1,11 \times 10^6$ <sup>a</sup>
<b>Ketoni</b>		
Acetoin	$6,82 \times 10^4 \pm 1,19 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$7,37 \times 10^4 \pm 1,28 \times 10^3$ <sup>a</sup>
6-Metil-5-hepten-2-on	$5,72 \times 10^6 \pm 9,97 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$6,87 \times 10^6 \pm 1,20 \times 10^5$ <sup>a</sup>
4-Okten-3-on	$1,55 \times 10^5 \pm 2,69 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$2,83 \times 10^5 \pm 4,92 \times 10^3$ <sup>a</sup>
<b>Ukupni ketoni</b>	$5,94 \times 10^6 \pm 1,04 \times 10^5$ <sup>b</sup>	$7,22 \times 10^6 \pm 1,26 \times 10^3$ <sup>a</sup>
<b>Terpeni</b>		
Limonen	$6,07 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^5$ <sup>b</sup>	$7,37 \times 10^6 \pm 1,28 \times 10^5$ <sup>a</sup>
Jilangen	$7,03 \times 10^4 \pm 1,23 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$9,59 \times 10^4 \pm 1,67 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Kopaen	$3,46 \times 10^5 \pm 6,03 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$3,03 \times 10^5 \pm 5,28 \times 10^3$ <sup>b</sup>
$\beta$ -Bourbonen	$4,41 \times 10^5 \pm 7,68 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$4,24 \times 10^5 \pm 7,39 \times 10^3$ <sup>b</sup>
$\beta$ -Kubeben	$9,55 \times 10^4 \pm 1,66 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$1,11 \times 10^5 \pm 1,93 \times 10^3$ <sup>a</sup>
$\beta$ -Kariofilen	$8,52 \times 10^4 \pm 1,48 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$9,29 \times 10^4 \pm 1,62 \times 10^3$ <sup>a</sup>
$\gamma$ -Elemen	$7,01 \times 10^4 \pm 1,22 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$1,11 \times 10^5 \pm 1,93 \times 10^3$ <sup>a</sup>
$\alpha$ -Humulen	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$
$\gamma$ -Murolen	$2,02 \times 10^5 \pm 3,52 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$1,51 \times 10^5 \pm 2,64 \times 10^3$ <sup>b</sup>
Germakren D	$9,04 \times 10^4 \pm 1,58 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$9,90 \times 10^4 \pm 1,72 \times 10^3$ <sup>a</sup>
$\delta$ -Gvajen	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$
$\alpha$ -Murolen	$2,45 \times 10^5 \pm 4,27 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$2,02 \times 10^5 \pm 3,52 \times 10^3$ <sup>b</sup>
3,7-Dimetil-2-okten-1-ol	$9,88 \times 10^4 \pm 1,72 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$1,51 \times 10^5 \pm 2,64 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Germakren B	$4,11 \times 10^4 \pm 7,16 \times 10^2$ <sup>a</sup>	$3,84 \times 10^4 \pm 6,68 \times 10^2$ <sup>b</sup>
Nerol	$7,96 \times 10^5 \pm 1,39 \times 10^4$ <sup>b</sup>	$8,99 \times 10^5 \pm 1,57 \times 10^4$ <sup>a</sup>
<b>Ukupni terpeni</b>	$8,65 \times 10^6 \pm 1,51 \times 10^5$ <sup>b</sup>	$1,00 \times 10^7 \pm 1,75 \times 10^5$ <sup>a</sup>
<b>Kiseline</b>		
Propanska kiselina	$9,81 \times 10^4 \pm 1,71 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$1,21 \times 10^5 \pm 2,11 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Butanska kiselina	$5,08 \times 10^5 \pm 8,85 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$6,56 \times 10^5 \pm 1,14 \times 10^4$ <sup>a</sup>
Pentanska kiselina	$4,69 \times 10^4 \pm 8,16 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$6,56 \times 10^4 \pm 1,14 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Heksanska kiselina	$4,02 \times 10^4 \pm 6,99 \times 10^2$ <sup>a</sup>	$3,84 \times 10^4 \pm 6,68 \times 10^2$ <sup>b</sup>
<i>E</i> -2-Heksenska kiselina	$1,06 \times 10^5 \pm 1,85 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$1,41 \times 10^5 \pm 2,46 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Oktanska kiselina	$1,28 \times 10^5 \pm 2,23 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$1,11 \times 10^5 \pm 1,93 \times 10^3$ <sup>b</sup>
Nonanska kiselina	$2,99 \times 10^5 \pm 5,21 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$2,83 \times 10^5 \pm 4,92 \times 10^3$ <sup>b</sup>
Dekanska kiselina	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$
<b>Ukupne kiseline</b>	$1,23 \times 10^6 \pm 2,14 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$1,42 \times 10^6 \pm 2,47 \times 10^4$ <sup>a</sup>

PORTAN K označava kontrolnu podlogu, a PORTAN SG podlogu za usporeni rast. <sup>a,b</sup>Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2. Analiza hlapljivih spojeva u listovima sorte 'Graševina'

U Tablici 8. navedene su vrijednosti analize pojedinačnih hlapljivih spojeva određenih u listovima sorte 'Graševina'. Uzimajući u obzir aldehide, najveća vrijednost APP određena je za *E*-2-heksenal. Statistički značajnija razlika uočena je za heksanal čije su vrijednosti APP bile veće kod 'Graševina' SG u odnosu na 'Graševina' K. Također, postoji statistički zapaženija razlika u vrijednosti APP i za heptanal koja je bila veća u slučaju 'Graševina' SG. Veće vrijednosti APP opažene su kod dekanala u varijanti 'Graševina' SG u odnosu na varijantu 'Graševina' K. Ovaj je spoj ujedno imao i najmanju vrijednost APP. Kod varijante 'Graševina' K fenilacetaldehid imao je najmanju vrijednost APP. U slučaju alkohola najveću vrijednost APP imao je benzilni alkohol bez obzira na varijantu pokusa. Od ketona, acetoin je imao najmanju vrijednost APP u obje varijante za razliku od 4-okten-3-on koji je imao najveću. Najveća vrijednost APP u slučaju kiselina određena je u slučaju propanska kiselina, dok je najmanju vrijednost imala heksanska kiselina neovisno o varijanti pokusa. Dekanska kiselina detektirana je kod 'Graševina' K za razliku od 'Graševina' SG. Među terpenima najmanju vrijednost APP imao je germakren B neovisno o varijanti pokusa. Statistički značajnija razlika u vrijednostima APP uočena je za limonen, ujedno i terpen s najvećom vrijednošću APP. Veće vrijednosti APP ovoga spoja bile su kod 'Graševina' K u odnosu na 'Graševina' SG.



**Tablica 8.** Sastav i sadržaj pojedinačnih hlapljivih spojeva određenih u listovima sorte 'Graševina'. Rezultati su izraženi u apsolutnim površinama pikova.

SPOJEVI	GRAŠEVINA K	GRAŠEVINA SG
<b>Aldehidi</b>		
Heksanal	$5,45 \times 10^6 \pm 9,50 \times 10^4$ b	$1,62 \times 10^7 \pm 2,81 \times 10^5$ a
Heptanal	$8,38 \times 10^5 \pm 1,46 \times 10^4$ b	$1,51 \times 10^6 \pm 2,64 \times 10^4$ a
Z-2-Heksenal	$7,47 \times 10^6 \pm 1,30 \times 10^5$ a	$6,16 \times 10^6 \pm 1,07 \times 10^5$ b
E-2-Heksenal	$8,18 \times 10^7 \pm 1,42 \times 10^6$ b	$9,90 \times 10^7 \pm 1,72 \times 10^6$ a
Oktanal	$2,22 \times 10^6 \pm 3,87 \times 10^4$ b	$4,24 \times 10^6 \pm 7,39 \times 10^4$ a
Nonanal	$3,33 \times 10^6 \pm 5,80 \times 10^4$ b	$4,75 \times 10^6 \pm 8,27 \times 10^4$ a
Z,Z-2,4-Heksadienal	$3,13 \times 10^6 \pm 5,45 \times 10^4$ b	$3,94 \times 10^6 \pm 6,86 \times 10^4$ a
E,E-2,4-Heksadienal	$1,11 \times 10^6 \pm 1,93 \times 10^4$ b	$1,31 \times 10^6 \pm 2,29 \times 10^4$ a
Dekanal	$7,77 \times 10^4 \pm 1,35 \times 10^3$ b	$1,31 \times 10^5 \pm 2,29 \times 10^3$ a
Benzaldehid	$5,96 \times 10^6 \pm 1,04 \times 10^5$ b	$6,36 \times 10^6 \pm 1,11 \times 10^5$ a
Fenilacetaldehid	$6,76 \times 10^4 \pm 1,18 \times 10^3$ b	$8,48 \times 10^4 \pm 1,48 \times 10^3$ a
4-Etil-benzaldehid	$5,45 \times 10^5 \pm 9,50 \times 10^3$ b	$6,46 \times 10^5 \pm 1,13 \times 10^4$ a
<b>Ukupni aldehidi</b>	$1,12 \times 10^8 \pm 1,95 \times 10^6$ b	$1,44 \times 10^8 \pm 2,51 \times 10^6$ a
<b>Alkoholi</b>		
Z-2-penten-1-ol	$2,93 \times 10^6 \pm 5,10 \times 10^4$ b	$6,06 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^5$ a
1-Heksanol	$2,32 \times 10^6 \pm 4,04 \times 10^4$ b	$4,44 \times 10^6 \pm 7,74 \times 10^4$ a
3-Metil-4-penten-1-ol	$7,77 \times 10^6 \pm 1,35 \times 10^5$ b	$1,11 \times 10^7 \pm 1,93 \times 10^5$ a
E-2-heksen-1-ol	$3,43 \times 10^6 \pm 5,98 \times 10^4$ b	$4,34 \times 10^6 \pm 7,56 \times 10^4$ a
Z-2-heksen-1-ol	$3,03 \times 10^5 \pm 5,28 \times 10^3$ b	$3,53 \times 10^5 \pm 6,16 \times 10^3$ a
2-Etil-1-heksanol	$1,31 \times 10^6 \pm 2,29 \times 10^4$ a	$6,66 \times 10^5 \pm 1,16 \times 10^4$ b
2,3-Butandiol	$3,13 \times 10^5 \pm 5,45 \times 10^3$ b	$4,54 \times 10^5 \pm 7,91 \times 10^3$ a
1-Oktanol	$2,22 \times 10^5 \pm 3,87 \times 10^3$ b	$3,94 \times 10^5 \pm 6,86 \times 10^3$ a
1,3-Butandiol	$3,13 \times 10^5 \pm 5,45 \times 10^3$ a	$2,52 \times 10^5 \pm 4,40 \times 10^3$ b
Benzilni alkohol	$4,54 \times 10^7 \pm 7,91 \times 10^5$ b	$4,85 \times 10^7 \pm 8,44 \times 10^5$ a
Fenilni alkohol	$1,01 \times 10^5 \pm 1,76 \times 10^3$ b	$2,01 \times 10^5 \pm 2,18 \times 10^3$ a
<b>Ukupni alkoholi</b>	$6,75 \times 10^7 \pm 1,18 \times 10^6$ b	$7,36 \times 10^7 \pm 1,28 \times 10^6$ a
<b>Ketoni</b>		
Acetoin	$6,26 \times 10^4 \pm 1,09 \times 10^3$ b	$6,76 \times 10^4 \pm 1,18 \times 10^3$ a
6-Metil-5-hepten-2-on	$2,02 \times 10^5 \pm 3,52 \times 10^3$ b	$2,42 \times 10^5 \pm 4,22 \times 10^3$ a
4-Okten-3-on	$2,93 \times 10^5 \pm 5,10 \times 10^3$ b	$5,35 \times 10^5 \pm 9,32 \times 10^3$ a
<b>Ukupni ketoni</b>	$5,57 \times 10^5 \pm 9,71 \times 10^3$ b	$8,45 \times 10^5 \pm 1,47 \times 10^4$ a

GRAŠEVINA K označava kontrolnu podlogu, a GRAŠEVINA SG podlogu za usporeni rast. Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-ovim testom ( $p < 0,05$ ).

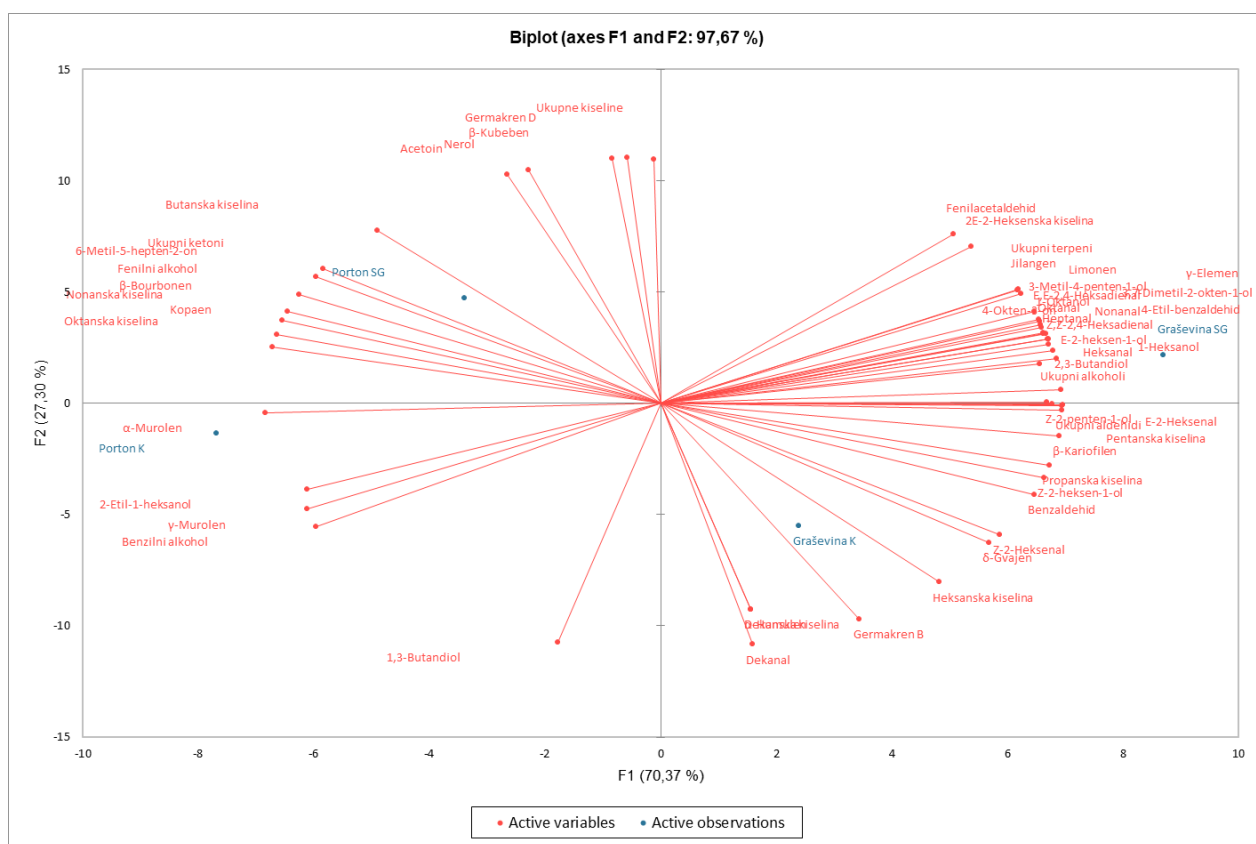
**Tablica 8.-nastavak** Sastav i sadržaj pojedinačnih hlapljivih spojeva određenih u listovima sorte 'Graševina'. Rezultati su izraženi u apsolutnim površinama pikova.

SPOJEVI	GRAŠEVINA K	GRAŠEVINA SG
<b>Terpeni</b>		
Limonen	$7,07 \times 10^6 \pm 1,23 \times 10^5$ a	$8,58 \times 10^5 \pm 1,49 \times 10^5$ b
Jilangen	$8,89 \times 10^4 \pm 1,55 \times 10^3$ b	$1,21 \times 10^5 \pm 2,11 \times 10^4$ a
Kopaen	$1,62 \times 10^5 \pm 2,81 \times 10^3$ a	$1,41 \times 10^5 \pm 2,46 \times 10^5$ b
$\beta$ -Bourbonen	$2,63 \times 10^5 \pm 4,57 \times 10^3$ a	$2,52 \times 10^5 \pm 4,40 \times 10^6$ b
$\beta$ -Kubeben	$8,68 \times 10^4 \pm 1,51 \times 10^3$ b	$1,01 \times 10^5 \pm 1,76 \times 10^4$ a
$\beta$ -Kariofilen	$1,11 \times 10^5 \pm 1,93 \times 10^3$ b	$1,21 \times 10^5 \pm 2,11 \times 10^4$ a
$\gamma$ -Elemen	$1,21 \times 10^5 \pm 2,11 \times 10^3$ b	$1,92 \times 10^5 \pm 3,34 \times 10^4$ a
$\alpha$ -Humulen	$7,98 \times 10^4 \pm 1,39 \times 10^3$ a	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^4$ b
$\gamma$ -Murolen	$1,62 \times 10^5 \pm 2,81 \times 10^3$ a	$1,21 \times 10^5 \pm 2,11 \times 10^3$ b
Germakren D	$8,58 \times 10^4 \pm 1,49 \times 10^3$ b	$9,39 \times 10^4 \pm 1,64 \times 10^5$ a
$\delta$ -Gvajen	$3,84 \times 10^5 \pm 6,68 \times 10^3$ a	$2,93 \times 10^5 \pm 5,10 \times 10^3$ b
$\alpha$ -Murolen	$1,72 \times 10^5 \pm 2,99 \times 10^3$ a	$1,41 \times 10^5 \pm 2,46 \times 10^4$ b
3,7-Dimetil-2-okten-1-ol	$1,51 \times 10^5 \pm 2,64 \times 10^3$ b	$2,32 \times 10^5 \pm 4,04 \times 10^6$ a
Germakren B	$4,54 \times 10^4 \pm 7,91 \times 10^2$ a	$4,24 \times 10^4 \pm 7,39 \times 10^5$ b
Nerol	$7,07 \times 10^5 \pm 1,23 \times 10^4$ b	$7,98 \times 10^5 \pm 1,39 \times 10^4$ a
<b>Ukupni terpeni</b>	$9,69 \times 10^6 \pm 1,69 \times 10^5$ b	$1,12 \times 10^7 \pm 1,96 \times 10^5$ a
<b>Kiseline</b>		
Propanska kiselina	$3,43 \times 10^5 \pm 5,98 \times 10^3$ b	$4,24 \times 10^5 \pm 7,39 \times 10^3$ a
Butanska kiselina	$2,42 \times 10^5 \pm 4,22 \times 10^3$ b	$3,13 \times 10^5 \pm 5,45 \times 10^3$ a
Pentanska kiselina	$1,01 \times 10^5 \pm 1,76 \times 10^3$ b	$1,41 \times 10^5 \pm 2,46 \times 10^3$ a
Heksanska kiselina	$4,54 \times 10^4 \pm 7,91 \times 10^2$ a	$4,34 \times 10^4 \pm 7,56 \times 10^2$ b
<i>E</i> -2-Heksenska kiselina	$1,21 \times 10^5 \pm 2,11 \times 10^3$ b	$1,62 \times 10^5 \pm 2,81 \times 10^3$ a
Oktanska kiselina	$6,87 \times 10^4 \pm 1,20 \times 10^3$ a	$5,96 \times 10^4 \pm 1,04 \times 10^3$ b
Nonanska kiselina	$1,82 \times 10^5 \pm 3,17 \times 10^3$ a	$1,72 \times 10^5 \pm 2,99 \times 10^3$ b
Dekanska kiselina	$5,55 \times 10^4 \pm 9,67 \times 10^2$ a	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$
<b>Ukupne kiseline</b>	$1,16 \times 10^6 \pm 2,02 \times 10^4$ b	$1,31 \times 10^6 \pm 2,29 \times 10^4$ a

Graševina K označava kontrolnu podlogu, a graševina SG podlogu za usporeni rast. <sup>a,b</sup>Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.3. Analiza PCA

Rezultati analize PCA prikazani su na Slici 18, a koja predstavlja odnos sorata i primijenjenih tretmana u prostoru definiranom s prva dva kanonička faktora, a koji objašnjavaju 97,67 % ukupne varijabilnosti (70,37 % za F1 i 27,30 % za F2). Slika također sadrži i vektore koji objašnjavaju korelacije originalnih varijabli i kanoničkih faktora u istom prostoru. Iz navedenog prikaza položaja sorata i tretmana u prostoru kao i povezanih korelacija vrijednosti APP i kanoničkih faktora može se definirati razlike u vrijednosti APP ovisno o sorti i tretmanu.



**Slika 18.** Prikaz analize PCA pojedinačnih hlapljivih spojeva koja predstavlja odnos sorata i primijenjenih tretmana u prostoru

## 5. Rasprava

U ovom radu praćen je uzgoj dviju sorata, 'Portan' i 'Graševina' u uvjetima *in vitro* na hranjivoj podlozi uobičajenog sastava te na podlozi za usporeni rast. S obzirom na to analiziran je postotak preživljavanja u istim uvjetima. Postotak preživljavanja biljaka u slučaju varijante 'Portan' K iznosio je 85 % dok je kod varijante 'Portan' SG on iznosio 95 %. Kod varijante 'Graševina' K postotak preživljavanja biljaka iznosio je 90 %, a kod varijante 'Graševina' SG je iznosio 95 %. Iz navedenog se uočava veći postotak preživljavanja biljaka kod varijanti uzgojenih na hranjivim podlogama kojima je dodan usporivač rasta alar-9 konačne masene koncentracije 0,4 mg/L, a što je u skladu s ranije provedenim istraživanjem (Hassanen i sur., 2013). U navedenom istraživanju ispitan je utjecaj dodatka alara-9 na rast, razvoj i preživljavanje dviju sorata ' Muškataleksandija' i 'Black monukka'. Nakon 90 dana udio preživljavanja biljaka na mediju SG bio je 100 % za obje analizirane sorte, dok je udio preživljavanja u mediju bez dodatka alara-9 bio niži te je iznosio 80 % u slučaju ' Muškataleksandije' odnosno 93 % u slučaju 'Black monukka'.

Analiza sekundarnih metabolita kao što su polifenolni i hlapljivi organski spojevi koristi se za karakterizaciju pojedinih sorata vinove loze, kao i u vidu biomarkera tijekom izloženosti biljke abiotskom ili biotskom stresu. Postoje brojni radovi u kojima je detaljno opisan sastav i sadržaj pojedinačnih spojeva u plodovima različitih sorata, međutim ovakvi podaci istraživanja provedeni na listovima vinove loze su rijetki, a ovakva istraživanja na listovima uvelike zaostaju za onima provedenim na plodovima. Potrebno je naglasiti i to da istraživanja provedena na listovima pojedinih sorata vinove loze odnose se na uzorke sakupljene sa biljaka koje su rasle u vinogradu ili plasteniku. Uzimajući u obzir da na sastav i sadržaj sekundarnih metabolita uvelike utječu uvjeti uzgoja vinove loze u vidu primjene različitih ampelotehničkih zahvata, okolišnih uvjeta, izloženosti različitim oblicima stresa i sl., ali i starost listova, pa je stoga nemoguće uspoređivati rezultate sadržaja pojedinačnih spojeva na apsolutnim razinama. Ovu usporedbu moguće je provesti na relativnoj razini u vidu veće ili manje zastupljenosti pojedinih spojeva.

U ovom radu detektirani su različiti spojevi koji pripadaju flavonol-3-*O*-glikozidima, flavan-3-olima, hidroksicimetnim i hidroksibenzojevim kiselinama te stilbenima bez obzira na sortu ili varijantu pokusa. Ovi rezultati su u skladu s ranije provedenim istraživanjima. Glikozilirani derivati kvercetina bili su najzastupljenija skupina pojedinačnih flavonol-3-*O*-glikozida. Ovakav

je rezultat dobiven i u ranijim istraživanjima (Ivančić, 2019, Šikuten i sur., 2020a, Štambuk i sur., 2022a, Šikuten i sur., 2022). Flavan-3-oli su skupina polifenolnih spojeva koja može biti sadržana u monomernom, ali u polimernim oblicima koji su izgrađeni o međusobno povezanih jedinica monomera. Isto tako ova skupina spojeva ulazi u strukturu staničnih stijenki (Tomaz, 2016). U uzorcima analiziranim u ovome radu ova je skupina spojeva najzastupljenija skupina polifenolnih spojeva. U istraživanjima koje su provele Ivančić (2019) te Štambuk i sur., (2022a) na uzorcima listova iz vinograda utvrđeno je da je ova skupina tek treća zastupljena skupina polifenola. Ove razlike se mogu objasniti starošću i stupnjem razvoja listova. U slučaju starijih listova veliki udio ove skupine spojeva sadržan je u polimernim oblicima, ali i kao građevne jedinice stanične stijenka, pa je njihova dostupnost za ekstrakciju uvelike umanjena, a što je bio slučaj s ranije provedenim istraživanjima. Najzastupljenija hidroksicimetna kiselina bila je kaftarinska kiselina, a što je u skladu s ranijim istraživanjima (Ivančić, 2019, Šikuten i sur., 2020a, Štambuk i sur., 2022a, Štambuk i sur., 2022b). Kao jedini predstavnik stilbena u svim analiziranim uzorcima detektiran je resveratrol-3-*O*-glukozid koji se smatra skladišnim oblikom resveratrola. Do reakcija biosinteze dimernih oblika resveratrola kao što su različiti viniferini dolazi pod utjecajem abiotičkog stresa prilikom napada različitih patogena (Štambuk i sur., 2022b). Odsutnost ovih spojeva u analiziranim uzorcima u skladu je s uvjetima njihovog uzgoja u izoliranim uvjetima bez izloženosti različitim patogenima.

Hlapljivi organski spojevi velika su skupina spojeva koji se značajno razlikuju s obzirom na fizikalno kemijska svojstva, a tvore približno 1 % sekundarnih metabolita biljaka. Sastav i sadržaj ove velike skupine sekundarnih metabolita razlikuje se s obzirom na analizirano tkivo (mladi i stari listovi, korijen, cvatovi, bobice različitog stadija zrelosti), ali i o tome jesu li pod utjecajem biotskog stresa tj. napada različitih patogena (Lazazzara i sur., 2022). Bez obzira na sortu i varijantu pokusa detektirani su brojni spojevi koji se s obzirom na kemijsku strukturu mogu podijeliti na aldehide, alkohole, ketone, terpene i kiseline. Ovo opažanje je u skladu s ranije provedenim istraživanjima (Weingart i sur., 2012, Alarcon i sur., 2015, Lazazzara i sur., 2022).

Na regulaciju različitih procesa tijekom rasta i razvoja biljke utječu brojne male molekule koje potječu iz različitih metaboličkih putova, a koje se nazivaju biljnim hormonima. Osim što utječu na procese tijekom rasta i razvoja, biljni hormoni imaju veliku ulogu u odzivu na abiotički i biotski stres. Općenito, oni su sadržani u vrlo niskim koncentracijama te mogu djelovati na mjestu

biosinteze, ali isto tako i na udaljenim mjestima u drugim tkivima i/ili organima. Biljni se hormoni mogu podijeliti na auksine, brasniosteroide, citokinine, gibereline, etilen, jasmonate, salicilate, abscizinsku kiselinu i dr. (Santner i sur., 2009). Giberelini su velika skupina tetracikličkih, diterpena te se smatraju regulatorima rasta. Ovi biljni hormoni reguliraju različite procese razvoja biljke kao što su izduživanje peteljke, rast i razvoj korijena, germinacija, dormantnost, cvatnja i dr. Biosinteza ove skupine spojeva odvija se putem metileritritol fosfata (MEP). Nakon nastanka geranigeranil difosfata ishodnog spoja u biosintezi diterpena, djelovanjem različitih enzima nastaju različiti giberelini kao što su GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> i GA<sub>7</sub> (Yamaguchi 2008). Usporivač rasta alar-9 naziva se još i daminozid te je prema kemijskom sastavu mono (2,2-dimetil hidrazid) butandionska kiselina te s obzirom na svoju strukturu nalikuje 2-oksoglutaratu (2-OG) ko-supstratu dioksigenaza ovisnih o 2-oksoglutaratu i Fe (II) (2-ODD). Mehanizam djelovanja ovog usporivača rasta nije u potpunosti poznat. Potvrđeno je da on inhibira kasni stadij biosinteze giberelina i to na način da djeluje kao inhibitor dviju 2-ODD, giberelin 3β-hidroksilaze i giberelin 2β-hidroksilaze na način da djeluje kao analog ko-supstrata 2-OG. Utvrđeno da je djelovanje alara-9 dovodi do značajnog smanjenja sadržaja giberelina GA<sub>1</sub> i GA<sub>8</sub> dok na sadržaj GA<sub>20</sub> nema utjecaj (Brown i sur., 1997). S obzirom na navedeno, opažanje da su analizirane biljke 'Graševina' SG i 'Portan' SG bile manje i sa slabije razvijenim korijenovim sustavom u odnosu na 'Graševina' K i 'Portan' K varijante može se pripisati inhibitorском učinku alara-9 na biosintezu giberelina.

Općenito, porodica enzima 2-ODD pripada u ne-hemske proteine te je vrlo rasprostranjena u biljnom carstvu. Kao što i sam naziv ukazuje, ova je porodica proteina ovisna o ionu Fe (II) kao ko-faktoru koji veže kisik i sudjeluje u reakciji oksidacije. Svi enzimi iz ove porodice kataliziraju dvo-elektronsku reakciju oksidacije primarnoga supstrata koja je povezana s oksidacijskom dekarboksilacijom ko-supstrata (2-OG) uz nastanak specifičnog produkta, sukcinata i CO<sub>2</sub>. Ova skupina enzima katalizira brojne reakcije oksidacije kao što su hidroksilacija, ciklizacija, epimerizacija, demetilacija i dr. te ima važnu ulogu u normalnom rastu i razvoju biljaka. Strukturnom analizom je utvrđeno da je domena za vezanje sačinjena od mjesta za vezanje Fe (II), 2-OG te primarnog supstrata. Slijed aminokiselina uključenih u vezanje Fe (II) vrlo je očuvan te se sastoji od motiva trijade HX(D/E)X<sub>n</sub>H. Dok su slijedovi aminokiselina za vezanje 2-OG i primarnog supstrata manje očuvani (Farrow i Facchini 2014). Biosinteza fenola u vinovoj lozi jedan je od dobro istraženih putova biosinteze u koji su uključeni brojni enzimi, uključujući i tri 2-OGG, flavanon-3-hidroksilazu (F3H), flavonol sintazu (FLS) te leukoantocijanidin dioksigenazu

(LDOX). Navedeni su enzimi uključeni u biosintezu pojedinih flavonol-3-*O*-glikozida i flavan-3-ola (Šikuten i sur., 2020a). Niže vrijednosti masenih udjela ovih skupina u varijantama pokusa 'Graševina' SG i 'Portan' SG u odnosu na masene udjele u varijantama 'Graševina' K i 'Portan' K mogu biti posljedica djelomične inhibicije navedenih enzima djelovanjem analoga 2-OG, alara-9 jer je domena za vezanje F3H, FLS i LDOX ima vrlo veliki stupanj sličnosti s domenom vezanja giberelin 3 $\beta$ -hidroksilaze, a što je potvrđeno analizom BLAST (engl. Basic Local Alignment Search Tool). U prilog navedenoj pretpostavci ide i istraživanje koje su proveli Rose i sur. (2012) na različitim humanim KDM2/7 histon demetilazama (JmjC oksigenaze). Kinetičkim i kristalografskim istraživanjima potvrdili su da daminozid selektivno inhibira djelovanje navedenih enzima. Ova skupina oksigenaza također je dio porodice enzima 2-OGG (Markolović i sur., 2016).

Tijekom početnog stadija razvoja biljke iz vršnog meristema rast i razvoj biljke ovisi isključivo o hranjivim tvarima sadržanim u hranjivoj podlozi, pa se može smatrati da se ovdje radi o heterotrofnom organizmu. Kako se nastavlja rast i razvoj biljaka, a posebice listova, biljčica je u mogućnosti vršiti fotosintezu, ali i dalje putem korijena uzima pojedine tvari iz hranjive podloge, a što se može smatrati miksotrofijom. Sadržaj klorofila može se smatrati jednim od pokazatelja aktivnosti fotosinteze (Kurahotta i sur., 1987). Veće vrijednosti masenih udjela u varijantama pokusa 'Graševina' SG i 'Portan' SG u odnosu na masene udjele u varijantama 'Graševina' K i 'Portan' K mogu biti posljedica veće fotosintetske aktivnosti biljaka uzgajanih u uvjetima SG. Povećana fotosintetska aktivnost u ovom slučaju može se vjerojatno pripisati slabijoj razvijenosti korijenovog sustava, a koji je posljedica inhibicije sinteze određenih giberelina. Poznato je da giberelini imaju veliku ulogu u rastu i razvoju meristema korijena (Shtin i sur., 2022). Isto tako maseni udio ukupnih karotenoida bio je veći u varijantama pokusa 'Graševina' SG i 'Portan' SG u odnosu na masene udjele u varijantama 'Graševina' K i 'Portan' K. Ovako opažanje može ukazivati na značajnu aktivnost u putevima biosinteze izopentil pirofosfata (IPP) i dimetilalil difosfata (DMAP), a koji su ishodišni spojevi za različite terpenoide, pa tako i karotenoide. Sinteza navedenih spojeva odvija se putem dvaju mehanizama, MEP i putem mevalonata (MVA). Navedena dva puta odvijaju se u različitim staničnim odjeljcima. Put MEP odvija se u plastidima, dok se put MVA odvija u citosolu. Postoji protok IPP i DMAPP između pojedinih odjeljaka, koji se vjerojatno odvija putem posebnih proteina prijenosnika (Dudareva i sur., 2004). S obzirom da je za biosintezu giberelina važan put MEP, a da do inhibicije dolazi u kasnijim fazama biosinteze giberelina, može se smatrati da alar-9 nema utjecaja na put MEP. Više vrijednosti APP

pojedinačnih terpena, monoterpena i seskviterpena u varijantama pokusa 'Graševina' SG i 'Portan' SG u odnosu na varijante 'Graševina' K i 'Portan' K u pozitivnoj su korelaciji sa višim vrijednostima ukupnih masenih udjela karotenoida, a što se vjerojatno može pripisati većoj aktivnosti putova MEP i MVA u varijantama SG. Vrijednosti omjera klorofila kao i omjera klorofila i karotenoida u skladu su s ranije provedenim istraživanjima (Niuroula i sur., 2019).

Kao odgovor na abiotski stres u vidu hladnoće, povišenog sadržaja soli te nedostatka vode, dolazi do značajnog smanjenja razine giberelina (Colebrook i sur., 2014). U signalnom putu koji se odvija u biljci, smanjena razina giberelina, a što je slučaj prilikom djelovanja alar-9, može biljci ukazivati da je pod utjecajem nekog od navedenih abiotskih stresova. Griesser i sur. (2015) istraživali su utjecaj nedostatka vode na APP različitih hlapljivih spojeva uključujući i heksanal, *E*-2-heksenal, oktanal, nonanal, *E,E*-2,4-heksadienal, dekanal, benzaldehid, fenilacetaldehid, 4-etil-benzaldehid te 6-metil-5-hepten-2-on te su utvrdili da on dovodi do značajnog povećanja vrijednosti APP u odnosu na uzorke listova uzetih s biljaka koje nisu bile izložene suši. S obzirom da su vrijednosti APP za navedene spojeve i ovom radu bile veće u slučaju biljaka koje su rasle u uvjetima SG u odnosu na kontrolnu varijantu, može se pretpostaviti da smanjena razina giberelina vjerojatno biljkama ukazuje na nedostatak vode te da one uslijed toga sintetiziraju više navedenih karbonilnih spojeva. Više vrijednosti APP 1-heksanola, *E*-2-heksen-1-ola, 1-oktanola, benzilalkohola te fenil alkohola određene kod biljaka uzgojenih u uvjetima SG u pozitivnoj su korelaciji s vrijednostima APP heksanala, *E*-2-heksanala, oktanela, benzilaldehida odnosno fenilacetaldehida, a što je u skladu s njihovim putem biosinteze. Poznato je da navedeni alkoholi djelovanjem određene alkohol dehidrogenaze nastaju iz pripadajućeg aldehida (Dudareva i sur., 2013).



## 6. Zaključak

U ovom radu provedeno je istraživanje utjecaja dviju vrsta hranjivih podloga na rast i razvoj biljaka dviju sorata vinove loze 'Portan' i 'Graševina', kao i na sadržaj i sastav pojedinačnih polifenolnih te hlapljivih organskih spojeva u njima. Temeljem dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Dodatkom alara-9 u hranjivu podlogu usporava se rast biljaka, a što se očituje u vidu njihove manje dužine stabljike i manjih dimenzija listova, dok u isto vrijeme udio preživljavanja je veći u odnosu na varijantu pokusa u čiju hranjivu podlogu nije dodan ovaj usporivač rasta.
2. Maseni udjeli gotovo svih analiziranih pojedinačnih fenola bili su manji u varijanti pokusa u kojemu je korišten usporivač rasta alar-9, a što se vjerojatno može pripisati inhibiciji određenih enzima 2-OGG u putu biosinteze polifenola. Navedenu pretpostavku je potrebno potvrditi dodatnim istraživanjima na razini enzima kinetičkim i kristalografskim istraživanjima. Bez obzira na niže masene udjele većine pojedinačnih fenola u uvjetima SG navedeno nema negativnog utjecaja na rast i razvoj biljaka jer u uvjetima *in vitro* biljke rastu u kontroliranim uvjetima bez izlaganja biotskom i abiotskom stresu u vidu UV-zračenja, napada patogena i sl.
3. Vrijednosti apsolutnih površina pikova pojedinačnih terpenoida (monoterpena i seskviterpena), aldehida i odgovarajućih alkohola bile su veće u varijantama pokusa u kojima je korišten usporivač rasta, bez obzira na analiziranu sortu. Navedeno ukazuje da su u uvjetima SG biljke u mogućnosti sintetizirati različite skupine hlapljivih spojeva.

Uzimajući u obzir ranije navedeno u konačnici može se zaključiti da je uporaba hranjive podloge za usporeni rast pogodna za potrebe čuvanja genetskog materijala vinove loze u uvjetima *in vitro*, a čime se smanjuje učestalost subkultivacije biljaka.

## 7. Literatura

- Alarcon, A. A., Lazazzara, V., Cappellin, L., Bianchedi, P. L., Schuhmacher, R., Wohlfahrt, G., Pertot, I., Biasioli, F., Perazzolli, M. (2015): Emission of volatile sesquiterpenes and monoterpenes in grapevine genotypes following *Plasmopara viticola* inoculation *in vitro*. **Journal of Mass Spectrometry** 50: 1013-1022.
- Aron, P. M., Kennedy, J. A. (2008): Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition & Food Research** 52: 79-104.
- Brown, R. G. S., Kawaide, H., Yang, Y. Y., Rademacher, W., Kamiya, Y. (1997): Daminozide and prohexadione have similar modes of action as inhibitors of the late stages of gibberellin metabolism. **Physiologia Plantarum** 101: 309-313.
- Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L., Hedden, P. (2014): The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. **Journal of Experimental Biology** 217: 67-75.
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J. (2004): Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology** 135: 1893-1902.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., Kaplan, I. (2013): Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist** 198: 16-32.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., Orlova, I. (2006): Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 25: 417-440.
- Farrow, S. C., Facchini, P. J. (2014): Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. **Frontiers in Plant Science** 5: 524.
- Gonzalez-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., Simal-Gandara, J. (2015): Wine Aroma Compounds in Grapes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 55: 202-218.
- Griesser, M., Weingart, G., Schoedl-Hummel, K., Neumann, N., Becker, M., Varmuza, K., Forneck, A. (2015): Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). **Plant Physiology and Biochemistry** 88: 17-26.

- Hassanen, S. A., Abidio, A. I. A., Aly, M. A. M., Rayan, G. A. (2013): *In vitro* preservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of alexandria and Black manukka cultivars as genetic resource. **African Journal of Basic and Applied Sciences** 5: 55-63.
- Ivančić, I. (2019): Promjene u sastavu i sadržaju fenolnih spojeva u listovima bijelih sorata vinove loze tijekom pojedinih fenofaza. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo, Zagreb.
- Jain, S. M., Häggman, H. (2007): Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer Science & Business Media, Dordrecht.
- Jelaska, S. (1994): Kultura biljnih stanica i tkiva: temeljna istraživanja i primjena. Školska knjiga, Zagreb.
- Karoglan Kontić, J., Preiner, D., Šimon, S., Zdunić, G., Poljuha, D., Maletić, E. (2009): Sanitary Status of Croatian Native Grapevine Varieties. **Agriculturae Conspectus Scientificus** 74: 99-103.
- Keller, M. (2020): The Science of grapevines. Academic press.
- Kurahotta, M., Satoh, K., Katoh, S. (1987): Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings. **Plant and Cell Physiology** 28: 1321-1329.
- Lazazzara, V., Avesani, S., Robatscher, P., Oberhuber, M., Pertot, I., Schuhmacher, R., Perazzolli, M. (2022): Biogenic volatile organic compounds in the grapevine response to pathogens, beneficial microorganisms, resistance inducers, and abiotic factors. **Journal of Experimental Botany** 73: 529-554.
- Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I. (2008): Vinova loza- ampelografija, ekologija, oplemenjivanje. Školska knjiga, Zagreb.
- Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I., Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Stupić, D., Andabaka, Z., Marković, Z., Šimon, S., i sur. (2015): Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- Markolović, S., Leissing, T. M., Chowdhury, R., Wilkins, S. E., Lu, X., Schofield, C. J. (2016): Structure–function relationships of human JmjC oxygenases – demethylases versus hydroxylases. **Current Opinion in Structural Biology** 41: 62-72.

- Marković, Z., Preiner, D. (2011): Biotehnologija u vinogradarstvu. Glasnik zaštite bilja. 55: 58-67.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.
- Niroula, A., Khatri, S., Timilsina, R. Khadka, D., Khadka, A., Ojha, P. (2019): Profile of chlorophylls and carotenoids of wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) microgreens. **Journal of Food Science and Technology** 56: 2758-2763.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., Bansel, Y. K. (2015): Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy** 9: 293-304.
- Pevalek-Kozlina B. (2003): Fiziologija bilja. Profil International, Zagreb.
- Pichersky, E., Noel, J. P., Dudareva, N. (2006): Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. **Science** 311: 808-811.
- Pierik, R. L. M. (1997): *In vitro* culture of higher plants. Springer science & business media, Dordrecht.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysegu, L. (2011): Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie-International Edition*. 50: 586-621.
- Rose, N. R., Woon, E. C., Tumber, A., Walport, L. J., Chowdhury, R., Li, X. S., King, O. N., Lejeune, C., Ng, S. S., Krojer, T., Chan, M. C., Rydzik, A. M., Hopkinson, R. J., Che, K. H., Daniel, M., Strain-Damerell, C., Gileadi, C., Kochan, G., Leung, I. K., Dunford, J., Yeoh, K. K., Ratcliffe, P. J., Burgess-Brown, N., von Delft, F., Muller, S., Marsden, B., Brennan, P. E., McDonough, M. A., Oppermann, U., Klose, R. J., Schofield, C. J., Kawamura, A. (2012): Plant Growth Regulator Daminozide Is a Selective Inhibitor of Human KDM2/7 Histone Demethylases. **Journal of Medicinal Chemistry** 55: 6639-6643.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., Estelle, M. (2009): Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology** 5: 301-307.
- Shtin, M., Dello Ioio, R., Del Bianco, M. (2022): It's Time for a Change: The Role of Gibberellin in Root Meristem Development. **Frontiers in Plant Science** 13: 882517.

- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., Salopek-Sondi, B. (2021): The Role of polyphenols in abiotic stress response: The Influence of Molecular Structure. **Plants** 10: 118.
- Šikuten, I., Štambuk, P., Karoglan Kontić, J., Maletić, E., Tomaz, I., Preiner, D. (2021): Optimization of SPME-Arrow-GC/MS Method for Determination of Free and Bound Volatile Organic Compounds from Grape Skins. **Molecules** 26: 7409.
- Šikuten, I., Štambuk, P., Andabaka, Z., Tomaz, I., Marković, Z., Stupić, D. Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Preiner, D. (2020a): Grapevine as a rich source of polyphenolic compounds. **Molecules** 25: 5604.
- Šikuten, I., Anić, M., Štambuk, P., Tomaz, I., Stupić, D., Andabaka, Ž., Marković, Z., Karoglan Kontić, J., Maletić, E., Karoglan, M., Preiner, D. (2020b): Biosynthesis and Profiling of Grape Volatile Compounds. U: Jordao, A. M. S. T. (ur.) *Vitis Biology and Species*. Nova Science Publisher, New York, str. 271-320.
- Štambuk, P., Anić, M., Huzanić, N., Preiner, D., Karoglan, M., Karoglan Kontić, J., Tomaz, I. (2022a): A Simple Method for the Determination of Polyphenolic Compounds from Grapevine Leaves. **Separations** 9: 24.
- Štambuk, P., Šikuten, I., Karoglan Kontić, J., Maletić, E., Preiner, D., Tomaz, I. (2022b): Leaf Polyphenolic Profile as a Determinant of Croatian Native Grapevine Varieties' Susceptibility to *Plasmopara viticola*. **Frontiers in Plant Science** 13: 836318.
- Tomaz, I. (2016): Optimiranje priprave uzoraka za analizu polifenolnih spojeva u kožici grožđa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Zagreb.
- Tomaz, I., Maslov, L., Stupić, D., Preiner, D., Ašperger, D., Karoglan Kontić, J. (2016): Solid-liquid extraction of phenolics from red grape skins. **Acta Chimica Slovenica** 63: 287-29.
- Torregrosa, L., Bouquet, A., Goussard, P. G. (2001): *In vitro* culture and propagation of grapevine. U: Roubelakis-Angelakis, K. A. (ur) *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*. Springer, Dordrecht, str. 281-326.

- Torres-Vinals, M., Sabate-Casaseca, S., Aktouche, N., Grenan, S., Lopez, G., Porta-Falguera, M., Torregrosa, L. (2004): Large-scale production of somatic embryos as a source of hypocotyl explants for *Vitis vinifera* micrografting. **Vitis** 43: 163-168.
- Wade, L. G. (2017): Organska kemija. Školska knjiga, Zagreb.
- Weingart, G., Kluger, B., Forneck, A., Krska, R., Schuhmacher, R. (2012): Establishment and Application of a Metabolomics Workflow for Identification and Profiling of Volatiles from Leaves of *Vitis vinifera* by HS-SPME-GC-MS. **Phytochemical Analysis** 23: 345-358.
- Yamaguchi, S. (2008): Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Biology** 59: 225-251.
- Zok, A., Zielinska, A., Oláh, R., Szegedi, E. (2017): *In vitro* multiplication and hardening of grapevine plants in aeriated media. **International Journal of Horticultural Science** 13: 15-18.

## 8. Životopis

Rođena sam u Zagrebu, u Republici Hrvatskoj. Osnovnu školu kao i Opću gimnaziju završila sam u Dugom Selu. Nakon završene srednje škole upisujem Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Za vrijeme trajanja studija metodičku praksu biologije imala sam priliku odraditi u Osnovnoj školi Josipa Jurja Strossmayera, a metodičku praksu kemije u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga.