

Primena savremenih teorijskih saznanja u oblasti fiziologije i ekologije voćaka i vinove loze

Djurdjina Ružić¹, Radmila Stikić², Slavica Todić², Milovan Veličković²

¹Institut za voćarstvo, 32000 Čačak, Kralja Petra I 9, Srbija
E-mail: jugvocca@yu1.net

²Poljoprivredni fakultet, 11080 Zemun, Nemanjina 6, Srbija

Primito: 13. januara, 2009; prihvaćeno: 13. februara, 2009.

Rezime. Nova saznanja u oblasti fiziologije i ekologije voćaka i vinove loze nalaze sve širu primenu u praksi. Posebno je značajno i neophodno ekološke faktore uskladiti sa biološkim potrebama gajenih vrsta/sorti voćaka i vinove loze, što za krajnji cilj mora imati visoku rodnost i odličan kvalitet plodova.

Aplikacija znanja iz biologije u praksi, koja je jedna od opštih definicija za široku oblast koju pokrivaju „biotehnologije“, biće prezentovana u radu sa najnovijim tehnikama prezervacije voćaka *in vitro*, a koje su nezaobilazni deo u savremenim repozitorijumima svetskih banki biljnih gena.

Globalni porast temperature, koji je evidentan, utiče na uslove života na našoj planeti i na promenu klime, pa presudan značaj za opstanak svih životnih sistema, a samim tim i voćaka i vinove loze, ima voda u zemljištu atmosferi, biljnim tkivima i organima. Svako odstupanje od optimalnog sadržaja ima za posledicu narušavanje fizioloških procesa u biljnom organizmu, a u uslovima dugotrajne suše, često dolazi i do uvenuća, odnosno sušenja stabala u rodu.

Fiziološki pokazatelji stresa suše, kao i reakcija vinove loze na deficit vlage biće prikazani u radu, kao i savremene *image* tehnologije (fluorescencije, multispektralne refleksije i termografije) koje su bazirane na poznavanju fizioloških procesa kod biljaka. Ove nedestruktivne i jednostavne metode se danas sve više primenjuju za potrebe optimizacije navodnjavanja, merenja stepena otpornosti biljaka na abiotičke i biotičke stresne faktore i u analizama kvantiteta i kvaliteta prinosa.

Ključne reči: biotehnologije, *in vitro* banka biljnih gena, vodni stres, fenolna jedinjenja, *image* tehnologije, termografija

Skraćenice: CS – Cold Storage (čuvanje u hladnim uslovima), LN – liquid nitrogen (tečni azot), DMSO – dimethyl sulfoxide, HF – hormone free (bez hormona), PVS2 – Plant Vittrification Solution no 2 (rastvor za vitifikaciju biljaka br. 2), TI – termalni image sistem (termografija), Ψ_{PD} – vodni potencijal lista pred zoru, Ψ_{leaf} – vodni potencijal lista u podne, Ψ_{stem} – vodni potencijal čokota.

Uvod

Biotehnologije. Termin „biotehnologija/e“ je danas mnogo u upotrebi, često veoma pogrešno, pa je veoma važno utvrditi tačno šta on predstavlja i za šta se sve može koristiti. Ovaj termin je prvi put upotrebio, 1919. godine Karl Ereky, mađarski inženjer (website:

www.alpacas.com/AlpacaLibrary/GlossaryAC.aspx).

Biotehnologija je tada opisana kao mitološko lice Janusa (Janus face), Boga vrata/kapija koji je ambivalentna ličnost, ili ima dve strane lica. Na jednoj strani su tehnike koje omogućavaju DNA manipulacije, ili prenošenje gena iz jednog organizma u drugi. Na drugoj strani to su relativno nove tehnologije koje su još

u fazi ispitivanja i treba ih sa pažnjom primeniti i koristiti, kao što su GMO organizmi. Od velikog broja definicija koje postoje izdvojene su samo neke koje se najčešće koriste:

- Svaka tehnika koja koristi žive organizme, ili delove organizama u svrhu modifikovanja proizvoda;
- Upotreba bioloških procesa u industriji (fermentacija kvasaca u proizvodnji alkohola, kultura biljnih ćelija za ekstrakciju sekundarnih metabolita...);
- Tehnologija bazirana na biologiji, posebno kada se koristi u poljoprivredi, medicini...;
- Primena bioloških procesa i organizama da bi se kreirali korisni proizvodi;
- Genetski inženjering i rekombinantna DNA tehnologija;
- Nauka koja koristi žive organizme i uključuje manipulacije uglavnom na molekularnom nivou da bi se kreirala nova praktična aplikacija u poljoprivredi, medicini...

Ova poslednja definicija se najčešće nalazi, ali mnogo više odgovara jedna, koja je najopštija i glasi: „Biotehnologije predstavljaju primenu znanja iz biologije za praktične potrebe“ (website: www.alpacas.com/AlpacaLibrary/GlossaryAC.aspx).

Osnovni cilj biotehnologija je poboljšanje/povećanje proizvodnje, ali u smislu adekvatnog kvaliteta i željenog kvantiteta (Altman, 1999). Na 12. kongresu voćara SCG u uvodnom referatu u sekciji *Fiziologija i ekologija voćaka*, prezentovane su kao biotehnologije mikropropagacija, PAM, transgene biljke, a veoma malo jedna važna oblast posvećena dugom čuvanju *in vitro* vrsta voćaka (Ružić *et al.*, 2005).

Na web adresi COST akcije 871 posvećenoj dugom čuvanju *in vitro* kultura može se naći da je oko 100.000 biljnih vrsta u opasnosti što predstavlja više od 1/3 svih biljnih vrsta na svetu. Biodiverzitet je posebno ozbiljno ugrožen u Evropi: 64 endemične vrste su izgubljene u poslednjoj dekadi, 24% vrsta i subvrsta su u opasnosti da nestanu, a intenzifikacija u poljoprivredi je smanjila iskorišćenost reka i jezera na oko 60% (<http://www.bi.w.kuleuven.be/dtp/tro/cost871/Home.htm>).

U većini zemalja u svetu, a posebno u Evropi postoje banke biljnih gena *in situ*, *ex situ* ali i u *in vitro* uslovima. Prvu banku biljnih gena u svetu je osnovao Nikolai Ivanovich Vavilov 1920. god. koji je započeo rad na kolekcionisanju genotipova u okviru različitih biljnih vrsta u preko 50 zemalja u svetu. On je organizovao preko 100 misija sakupljanja/kolekcionisanja

između 1915-1930. godine sa idejom o stvaranju centara porekla ('centres of origin') biljaka u regionima sa visokim diverzitetom biljnih vrsta. U Institutu za biljnu industriju – St Petersburg (Research Institute of Plant Industry, VIR), u kome je N.I. Vavilov radio stvorena je najveća banka gena na svetu koja je jedna od 1.500 banki biljnih gena širom sveta u kojima se nalazi 6 miliona aksešena (<http://www.new-agri.co.uk/05-1/develop/dev03.html>). Ali one su mnogo više nego „muzeji biljaka“.

Genetički resursi, odnosno banke biljnih gena se održavaju uglavnom *in situ* u polju. Takve kolekcije su pogodne za rad oplemenjivača, ali sa druge strane zahtevaju dosta prostora (zemljišta), a i održavanje je skupo. Takođe, moguć je konstantni napad od bolesti, štetočina i spoljnih abiotskih faktora stresa.

Stoga uspostavljanje savremene kolekcije germplazme obavezno podrazumeva *in vitro* tehnike čuvanja biljaka/voćaka koje su važna alternativa u odnosu na klasično čuvanje germplazme u polju.

In vitro tehnologija upotrebljena za konzervaciju vrsta voćaka, kao genetičkih izvora, još je 1983. god. proglašena za treći važan prioritet propisan od strane IBPGR savetodavnog Komiteta „*In Vitro Storage*“ (IBPGR, 1983).

Prema dužini *in vitro* čuvanja germplazme postoji podela na kratko, srednje i dugo čuvanje kultura (Whiters i Engelman, 1997).

Primena nedestruktivnih fizioloških image metoda u poljoprivredi. Poslednjih godina se u fiziologiji gajenih biljaka veoma intenzivno koriste nedestruktivne *image* metode za monitoring i ispitivanje fizioloških procesa i, posebno, reakcije biljaka na stresne uslove i navodnjavanje. *Image* metode, uz pomoć posebnih kamera, prate refleksiju i emisiju radijacije različitih talasnih dužina sa površine biljnih delova i zatim se ti podaci analiziraju specifičnim softverskim sistemima. Kako su metode jednostavne i nedestruktivne, sve više se praktično primenjuju u savremenoj poljoprivredi.

Ove nove tehnologije se koriste od ćelijskog i nivoa celih biljaka, do nivoa agroekosistema. Na ćelijskom i subćelijskom nivou primena npr. konfokalne mikroskopije je dovela do revolucionarnih promena u obeležavanju ćelijskih procesa, dok su *imaging* metode na ćelijskom i nivou organa pomogle u objašnjenju procesa kao što su npr. fotosinteza, transport vode, otpornost biljaka na različite abiotičke i biotičke stresne faktore i sl. (Barbagallo *et al.*, 2003). Primena ovih

metoda kao geofizičkih tehnika omogućava da se vizualno prate podaci u sistemu zemljište-voda-biljka (Verstraeten et al., 2006).

Metode fluorescencije. Do sada su najveću primenu od *image* metoda ostvarile metode koje su bazirane na merenju *fluorescencije hlorofila*, kao i merenju *infracrvenog termalnog zračenja (termografije)*. Fluorescencija je vezana za aktivnost fotosistema i ukazuje na njegovu funkcionalnost, odnosno na odvijanje procesa fotosinteze (Krause i Weis, 1991). Kada se koristi višebojni fluorescentni *image* sistem odnos između fluorescencije kraćih talasnih dužina hlorofila (F690) i dužih (F740), može se koristiti kao pokazatelj fotosintetske aktivnosti i sadržaja hlorofila u listovima (Lichtenhaler et al., 2005). Postoji veliki broj komercijalnih aparata kojima se meri fluorescencija u oblasti dugotalasne crvene fluorescencije hlorofila. Ispitivanja fluorescencije su doprinela ne samo saznanju o procesu fotosinteze, već i o tome kako različiti abiotički i biotički stresni faktori deluju na ovaj proces. To je od posebnog značaja jer od procesa fotosinteze zavisi i prinos i kvalitet prinosa poljoprivrednih kultura uključujući vrste voćaka i vinovu lozu (Lenk et al., 2007).

Fluorescentne i reflektivne kamere (mere refleksiju u crvenom, zelenom i plavom delu spektra) se sve više koriste i kao brze metode za ocenu zrenja i kvaliteta plodova (posebno količine šećera). Rezultati više autora su pokazali korelaciju između opadanja koncentracije hlorofila i procesa sazrevanja plodova kod banane (Smilie et al., 1987) i kivija (Kempner et al., 1992). Primena fluorescencije hlorofila kod bobica grožđa je ukazala na vreme završetka njihovog sazrevanja (Lenk et al., 2007).

Metode *image* fluorescencije hlorofila takođe omogućavaju da se vizuelno oceni interakcija patogen-biljka (Berger et al., 2007). Poseban značaj ove metode dobijaju i u ispitivanju mehanizama otpornosti biljaka na dejstvo patogena. Kao odgovor biljaka na dejstvo patogena može doći do akumulacije fenola. Ova jedinjenja imaju osobinu da emituju fluorescentno zračenje posle UV ekscitacije, tako da primena ove metode može vizuelno da ukaže na stepen osetljivosti neke biljne vrste na dejstvo patogena (Lenk et al., 2007).

Image tehnologije koje su bazirane na merenju tzv. RGB refleksije (u oblasti crvenog, zelenog i plavog deo spektra) se takođe sve više primenjuju za potrebe praćenja rastenja biljaka (Walter i Schurr, 2005).

Svoju primenu ove metode nalaze za pravljenje modela rastenja i potrebe predikcije prinosa (Kaminuma et al., 2004).

Infracrveno termalno zračenje (termografija). Od *image* metoda najviše se koriste tzv. *termalne image* (TI) metode za ispitivanja vodnog režima listova (transpiracije i reakcija stoma), celih biljaka ili useva. Metoda *infracrvene termometrije* ili *termografija* je bazirana na detekciji zračenja infracrvene radijacije koja se emituje od strane neke površine, odnosno u slučaju biljaka od strane listova ili plodova biljaka (Fush, 1990).

Infracrvene kamere detektuju infracrveno zračenje koje je za ljudsko oko nevidljivo i pretvaraju ga u električne signale, koji se potom procesuiraju u analoge koji odgovaraju površini sa koje se zračenje emituje. Kako u ovom delu spektra (8-14 μ) nema razlike u boji, paleta nijansi boja od plave do crvene i žute je dodata da bi se vizuelno predstavile temperaturne razlike u formi obojenih traka ili površina. Infracrveni termometri koji mere na površini zemlje ili termalni visinski skeneri (satelitski ili avionski) su dva tipa instrumenata koji se koriste za merenje temperature listova ili useva. Oba instrumenta mere emitovanu radijaciju sa ispitivanih površina i koreliraju ih sa temperaturom u skladu sa Stefa-Boltzmannovim zakonom.

Teorijski, primena metode infracrvene termometrije ili termografija kod biljaka je bazirana na tome da transpiracija, kao i razmena energije između listova i okolne atmosfere, određuju temperaturu listova ili plodova. Ukoliko su biljke izložene suši dolazi do zatvaranja stoma i opadanja transpiracije i stoga temperatura listova raste, a to se emituje u formi dugotalasne infracrvene radijacije. Na *image* termo infra kameri to se manifestuje u formi preovlađujućih crveno/žuto obojenih površina (Jones, 2004 a).

U literaturi je sve više podataka o primeni TI metoda, posebno za potrebe navodnjavanja biljaka (Mahan et al., 2000; Jones, 2004 b). Tako su Guiliani i Flore (2000) primenom ove metode utvrdili stepen stresa suše kod jabuke. Sepilcre-Cantó et al. (2007) su koristili visinske avionske skenere (AHS - Airborne Hyperspectral Scanner) za ocenu vodnog režima i prinosa masline i breskve. Njihovi rezultati su pokazali da TI metoda može da ukaže ne samo na potrebe za navodnjavanjem, već i da pomogne u identifikaciji parametara prinosa. Ovi rezultati su takođe ukazali da je moguće za potrebe termografske detekcije koristiti po-

datke sa satelita ASTER. Jones et al. (2002) i Grant et al. (2007) su pokazali da se TI metoda može koristiti za potrebe optimizacije navodnjavanja vinove loze.

Bulanon et al. (2008) su pokazali da se TI metodom može odrediti i stepen zrenja plodova citrusa, dok su Stajanko et al. (2004) primenom slične metode bili u stanju da prate sezonsku dinamiku rasteanja plodova jabuke. Sve više se koristi i kombinacija termalnih i image metoda fluorescencije hlorofila, a to omogućava da se dijagnostikuje ne samo vodni status biljaka, već komplementarno i proces fotosinteze (Chaerle et al., 2007).

Imajući u vidu značaj koje *image* metode, kao jednostavne i nedestruktivne, mogu da imaju u detekciji stresnih faktora, Evropska Zajednica je 2002. godine u okviru svog projekta STRESSIMAGING (HPRM-CT- 2002-00254) pokrenula mrežu treninga u *image* metodama za mlade istraživača iz većeg broja zemalja. To je rezultiralo i organizovanje simpozijuma *Image Technique for Understanding Plant Responses to Stress*, koji je u toku 2006. godine održan u Velikoj Britaniji.

Image metode su kod nas veoma malo poznate tako da je cilj ovog rada bio da se da njihov kratak pregled i da se na primeru vinove loze pokaže kako termografske (TI) metode mogu da doprinesu optimizaciji navodnjavanja ove kulture.

Fiziološki indikator stresa suše; Uticaj vodnog deficita na kvalitet vinskog grožđa. Vodni status biljke je značajan činilac kvaliteta grožđa, obzirom na značaj koji voda ima na pravac i intenzitet fizioloških procesa u biljci i razvoj vegetativnih i generativnih organa.

U ekofiziološkim istraživanjima je prisutno nekoliko parametara koji se mogu koristiti kao pokazatelji vodnog režima biljke. Neki od pokazatelja predstavljaju direktne vrednosti vodnog režima biljke, kao što su relativni sadržaj vode (RWC) i vodni potencijal lista (Ψ). Drugi su pod uticajem vodnog režima i predstavljaju indirektno vrednosti, kao što su stomatalna provodljivost, intenzitet transpiracije, usisna sila lišća, temperatura lista. Vodni potencijal lista je jedan od najvažnijih fizioloških pokazatelja vodnog režima biljke. Predstavlja termodinamički parametar kojim se opisuje energetska status vode u zemljištu i biljkama (Slatyer i Taylor, 1960). Primenjuju se tri načina merenja: vodni potencijal lista pred zoru (Ψ_{PD}), vodni potencijal lista u podne (Ψ_{leaf}) i vodni potencijal čokota (Ψ_{stem}). Rezultati istraživanja ukazuju da je Ψ_{PD} , vrlo efikasni i jedan od najpouzdanijih pokazatelja vod-

nog statusa čokota i kao takav veoma pogodan za ranu detekciju vodnog deficita kod vinove loze (Jones, 2007).

Vodni status čokota je definisan klimatskim (padavine, potencijalna evapotranspiracija), zemljišnim uslovima (vodni kapacitet zemljišta) i elementima sistema gajenja (veličina čokota, lisna površina). Uslovi obezbeđenosti čokota vodom predstavljaju ključni faktor *terroir* efekta na enološki potencijal grožđa i kvalitet proizvedenog vina (Van Leeuwen i Seguíni, 2006).

Rezultati brojnih istraživanja ukazuju da je kvalitet grožđa a time i enološki potencijal sorti pod uticajem vodnog režima u vinogradu. U uslovima bez navodnjavanja kada je loza suočena sa određenim vodnim deficitom dolazi do, za kvalitet vinskih sorti, značajnih promena u strukturi i hemijskom sastavu bobice (Duteau et al., 1981; Tregoat et al., 2002). Efekat zavisi od intenziteta suše, faze razvoja bobice i opterećenja čokota rodnom (Van Leeuwen i Seguíni, 2006).

„Cold storage“ (minimal growth storage, low temperature storage, konzervacija iznad temperature zamrzavanja)

U spešno čuvanje na hladnom u *in vitro* uslovima, tzv. „Cold storage“, koje pripada kratkom ili srednje dugom čuvanju je za svaku biljnu vrstu genetički determinisano, ali zavisi i od: temperature čuvanja, osvetljenja, sastava medijuma (modifikacije medijuma dodavanjem nekog osmotikuma, ili retardanata rasteanja) i prekondicioniranja pre snižavanja temperature (Jouve et al., 2000), ili modifikacije vazdušnog sastava u posudama za gajenje i dr.

Ranih 90' godina ova tehnika je uspešno primenjena kod mnogih vrsta voćaka, kao kod jagode (Wilkins et al., 1988; Reed, 1992), *P. avium* (Janero et al., 1995, Ružić i Cerović, 1999), *P. domestica* (Ružić i Cerović, 1990), *P. cerasus* (Borkowska, 1986; 1990), *P. persica* (Leva et al., 1992), ali i u skorije vreme kod trešnje (Petrevica i Bite, 2003) i drugih vrsta biljaka, kao što je *Hibiscus moscheutos* (West et al., 2006), Poplar hibrid (Son et al., 2004), etc.

Iako pripada srednje dugom čuvanju kultura ova tehnika se koristi danas u velikim repozitorijumima banke biljnih gena kao npr. u Oregonu (USA) gde se neke sorte jagoda čuvaju duže od 1,5 godine (Kovalchuk i Reed, 2004), ili takođe jagodaste vrste voćaka u Rumuniji (Popesku et al., 2004).

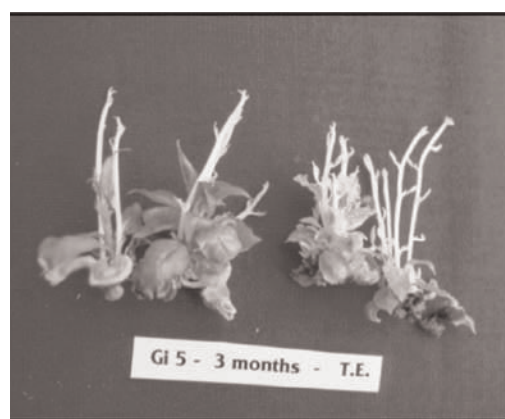
Ovom metodom kulture se mogu čuvati 2 i više godina, a najčešće 12 meseci između supkultura (Lambardi i de Carlo, 2003). Sastoji se u čuvanju *in vitro* kultura u veoma jednostavnim uslovima, t.j., na temperaturi od -3 do +12°C, u mraku ili sa nekom kombinacijom kratkih svetlosnih fotoperioda (Marino, 1997). Međutim, preko 60% biljnih vrsta se čuva između 2-5°C. Koriste se mini-reznice dužine do 1 cm, a su medijumi su uglavnom standardni sa regulatorima rastezanja ili HF, uz retardante rastezanja ili osmotski aktivne komponente. Prednosti ove metode su što zahteva veoma jednostavne uslove i što omogućava brzo umnožavanje kultura kada je to potrebno uz održivu vijabilnost kultura sa dobrim kapacitetom ponovnog

rastezanja ('regrowth') (Lambardi i de Carlo, 2003).

U laboratoriji za *in vitro* kulturu biljnog tkiva Instituta za voćarstvo u Čačku ovom metodom čuvana je šljiva cv Požegača 10 meseci posle čega je dobijena normalna vijabilnost i multiplikacija izdanaka (Ružić i Cerović, 1990) (Sl. 1 a); zatim podloge za trešnju Gisela 5 i Tabel Edabriz (Ružić i Cerović, 1999) (Sl. 1 b), i malina cv Meeker, 3 meseca (Ruzic et al., 2008) (Sl. 1 c). Osnovna karakteristika izdanaka čuvanih na hladnom je etioliranost izdanaka posle CS, sa vijabilnim vrhovima i pojavom sporadične nekroze donjih bazalnih listova, a zatim po postavljanju u standardne uslove gajenja, potpuni povratak kultura u prvobitno stanje (Sl. 1 d).



a)



b)



c)



d)

Sl. 1. Šljiva cv Požegača 10 meseci posle CS (a); podloge za trešnju Gisela 5 i Tabel Edabriz 3 meseca posle CS (b); malina cv Meeker 3 meseca posle CS (c); malina cv Meeker 20 dana posle CS – prva supkultura (Originalne fotografije – Institut za voćarstvo, Čačak)
Plum cv Požegača 10 months upon maintenance in CS (a); Gisela 5 sweet cherry rootstock and Tabel Edabriz 3 months upon maintenance in CS (b); raspberry cv Meeker 3 months upon maintenance in CS (c); raspberry cv Meeker 20 days upon maintenance in CS – the first subculture (Original photos – Fruit Research Institute, Čačak)

Krioprezervacija (kriokonzervacija) – two-step freezing

Krioprezervacija pripada dugom čuvanju kultura i predstavlja zamrzavanje ćelija, tkiva ili organa u struji tečnog azota na ultra niskim temperaturama (-196°C) u prisustvu zaštitnog agensa (krioprotektanta) i njihovo čuvanje u zamrznutom stanju, a zatim ponovni rast/regrowth iz ovih biljnih delova. Ova Cryo tehnika koristi metod sporog hlađenja u kome se postiže optimalna dehidracija ćelija kontrolisanim zamrzavanjem eksplantata na -40°C pre potapanja u LN (two-step freezing). Sporo hlađenje se sprovodi u prisustvu krioprotektanta, uglavnom DMSO u koncentraciji od 5–15% (Panis i Lambardi, 2005). Kada se postigne temperatura od oko -40°C (Sl. 2 a), intraćelijski rastvor je koncentrovan dovoljno da se vitrifikuje posle potapanja u LN (Sl. 2 b). Stopa preživljavanja kultura se kreće od 34% do 92% (Lambardi i De Carlo, 2003).

Procedura krioprezervacije je razvijena za oko 200 vrsta *in vitro* biljnog tkiva, ali za svaku vrstu potrebno je da se razvije poseban protokol.

Uspeh ove metode zavisi od prirodne otpornosti na zamrzavanje, veličine i tipa eksplantata, sadržaja vode i dr. Primena krioprezervacije se zasniva na fizičkom procesu *vitifikacije* u kome ćelijski sadržaj postaje amorfan pa se putem brzog zamrzavanja izbegava formiranje intracelularnih kristala leda koji mogu da prouzrokuju oštećenja membrane, menjajući njenu semipermeabilnost (Panis i Lambardi, 2005). Formira-

nje kristala bez ekstremne redukcije celularne vode se jedino može postići upravo vitrifikacijom.

Ova metoda se danas uglavnom koristi za neorganizovana tkiva, kao što su ćelijske suspenzije i kalusi.

Kriokonzervacija se ne može primeniti na sve genotipove, pa se poslednjih godina uvodi metoda „enkapsulacije“.

Enkapsulacija

Metoda „enkapsulacije“ predstavlja čuvanje vrhova izdanaka u Ca-alginatu, odnosno u alginatnom matriksu.

Prema Lisek i Orlikowska (2004) prednosti ove metode su:

- ušteda prostora (čuvanje se sprovodi u alginatnim perlicama *in vitro*, na temperaturama iznad nule);
- lako se vrši razmena sterilnog materijala između laboratorija;
- mogu se biljke razmnožavati kada je potrebno;
- brza je i komercijalizacija i širenje novih sorti/vrsta.

Metoda je široko primenjena, pa su tako Adriani *et al.* (2000) u alginatnim perlicama uspešno čuvali kiwi cv Hayward i dobili konverziju, odnosno porast kultura posle enkapsulacije, kada su kao eksplantate koristili somatske embrione (tzv. sintetičko seme, ili Synseed), ali i mikroreznice. Takođe, Brischia *et al.* (2002) su razvili tehnologiju sintetičkog semena za



a)



b)

Sl. 2. Zamrzavanje eksplantata na -40°C 1 čas u cryo posudama u Mr Frosty aparatu (a), potapanje cryo posuda sa eksplantatima oko 40 min u LN (b) (Originalne fotografije iz Nitra – Slovačka, Institut za biljnu genetiku i biotehnologije)

Freezing of explants at -40°C 1 hour in cryo vessels in Mr Frosty unit (a); immersing cryo vessels containing explants, about 40 min in LN (b) (Original photos – Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Nitra, Slovakia)

podlogu M. 26, zatim Tsvetkov i Hausman (2005), i mnogi drugi.

Metoda se sastoji u tome da se 3-5 mm vrhovi izdanaka urone u Na-alginat, zatim se prenesu u 75 mM CaCl₂, mešaju na magnetnoj mešalici 30 min., a zatim se vrši ispiranje u vodi 10 min. (3 x 3 min.). Formirane perlice se čuvaju na filter papiru u petri kutijama koje su oblepljene sa parafilmom, iznad 0°C (Sl. 3 a). Međutim, od ovih prvih početaka, metoda je modifikovana (Derendre *et al.*, 1990) po kojoj se posle formiranja, alginatne perlice prenose u posudice sa silica gelom na sušenje, odnosno dehidraciju, a zatim u Cryovials posude i ubacuju u LN. Dalja procedura

zavisi od dužine čuvanja biljnog materijala. U Institutu za voćarstvo u Čačku su dobijeni prvi rezultati te vrste u našoj zemlji gde je 18,8% vrhova izdanaka kupine cv Čačanska bestrna preživelo enkapsulaciju posle 1 meseca i multipliciralo, dok je kod maline cv Meeker 6,3% preživelo enkapsulaciju i dalo ponovni rast i multiplikaciju (Sl. 3 b, c, d)

Vitrifikacija

„Vitrifikacija“ predstavlja izlaganje eksplantata visokoj koncentraciji rastvora za vitrifikaciju uz osmotsku dehidraciju ćelija, koristeći krioprotektant kao pretretman, a zatim brzo hlađenje u cryo posudama, ili di-



a)



b)



c)



d)

Sl. 3. Eksplantat kupine enkapsuliran u alginatnoj perlici (a); posle enkapsulacije – ponovni rast izdanaka kupine cv Čačanska bestrna (b) i maline cv Meeker (c); multiplikacija izdanaka kupine u 5. supkulturi posle enkapsulacije (d); (Originalne fotografije – Institut za voćarstvo, Čačak)
A blackberry explant encapsulated in an alginat pearl (a); upon encapsulation – regained growth of blackberry shoot of cv Čačanska Bestrna (b); and rasperry cv Meeker (c); the multiplication of a blackberry shoot in the fifth subculturies upon encapsulation (d) (Original photos – Fruit Research Institute, Čačak)

rektno u LN. Eksplantati se tretiraju sa vitrifikacionim rastvorom određeni period (od 15 min do 2 sata) praćeno sa direktnim potapanjem u LN (*one-step freezing*).

Prvi radovi o upotrebi vitrifikacionog rastvora su se pojavili 1990. godine (Sakai *et al.*, 1990).

Najčešće korišćen vitrifikacioni rastvor je PVS2 koji sadrži: 30% glycerol, 15% ethylene glycol, 15% DMSO (v/v) i 0,4 M saharoze.

Mnogo godina posle ovih prvih radova ovo je još uvek najšire primenjen protokol za krioprezervaciju.

Prednosti ove metode su: eksplantati se direktno potapaju u LN; sačuva se integritet celog organa; laka je metoda; visoka je reproduktivnost i može se primeniti na veliki broj vrsta biljaka.

Enkapsulacija-dehidracija

Ova tehnika je, kao što je pomenuto, modifikovana metoda enkapsulacije, t.j. prvo se eksplantati enkapsuliraju u alginatnim perlicama, a onda se kompleks eksplantat/perlica podvrgava *double-step* procesu za otklanjanje smrznute vode među tkivom. Posle dehidracije perlice se direktno potapaju u LN.

Prednosti ove metode su: laka je manipulacija i zaštita osetljivih eksplantata; bolja je kontrola dehidracije eksplantata; kao i stimulacija ponovnog rasta posle krioprezervacije (Lambardi i De Carlo, 2003).

Preko 50% vrsta biljaka ima stopu preživljavanja posle krioprezervacije ovom tehnikom, oko 80% i više. Maksimalno preživljavanje je dobijeno kod jabuke *Malus spp.* – preko 91% (Lambardi i De Carlo, 2003).

Enkapsulacija-vitrifikacija

Ova tehnika je novijeg datuma i predstavlja kombinaciju enkapsulacije eksplantata sa upotrebom vitrifikacije. Uspešno je primenjena kod krioprezervacije jabuke (Paul *et al.*, 2000) i šljive (De Carlo *et al.*, 2000).

Druge procedure krioprezervacije

Neke nove tehnike koje još nisu našle širu primenu su:

1. „Droplet vitrification“ tehnika podrazumeva tretiranje eksplanata sa verifikacionim rastvorom i zamrzavanje mikrokapljica sa eksplantatima (kapljice sa eksplantatima se postavljaju na aluminijumske trake) direktnim potapanjem u LN.

2. Najnovija tehnika za spavajuće vegetativne pupoljke je primenjena kod 1.950 aksešena jabuke (Panis i Lambardi, 2005). Grančice sa pupoljcima se kolekcionišu u zimu i smeste u hladnu sobu na -5°C uz 30% vlažge, a zatim se sporo hlade na -30°C (1°C/h) gde ostaju 24 h pre nego što se prenesu u LN. Prema Panisu i Lambardi - u (2005), posle ovog načina čuvanja na hladnom i kalemljenja pupoljaka na odabrane podloge, 90% aksešena je imalo stopu preživljavanja preko 30%.

Potrebno je razviti protokole za mnoge vrste biljaka, a najvažniji parametri koji bi trebalo optimizirati su pripremna faza za tkiva na dehidraciju (šećeri i hladni tretmani) i dužina izlaganja eksplantata u vitrifikacionom rastvoru, ali razviti i druge vitrifikacione smeše ili nove, obećavajuće tehnike, kao što je enkapsulacija-vitrifikacija.

Kriobanke biljnih gena drvenastih vrsta

Vrste voćaka koje se uglavnom vegetativno razmnožavaju zahtevaju konzervaciju ogromnog broja aksešena, uključujući stare i nove selekcionisane sorte, lokalne i divlje vrste. Konzervacija npr. evropske germplazme *Prunusa* zahteva održavanje preko 30.000 aksešena u repozitorijumima u polju u okviru 21 države. Zato su nove tehnike čuvanja komplementarne sa tradicionalnim, a sve u smislu razvijanja više opcija za konzervaciju, kako bi se sprečio bilo kakav gubitak biljnih genetičkih resursa. Vredno je pomenuti sledeće kriobanke drvenastih vrsta (Panis i Lambardi, 2005):

– National Seed Storage laboratory – Fort Collins (USA), sa oko 2.100 aksešena jabuke (spavajući pupoljci);

– National Clonal Germplasm Repository – Corvallis (USA), sa preko 100 aksešena kruške (vrhovi izdanaka);

– AFOCEL iz Francuske sa preko 100 aksešena bresta (spavajući pupoljci);

– National Institute of Agrobiological Resources iz Japana sa oko 50 aksešena duda;

– Tropske i subtropske drvenaste vrste u ORSTOM – Francuska i National Bureau of Plant Genetic Resources iz Indije.

Genetički integritet – stabilnost krioprezerviranih biljaka

U prošlosti su brojni radovi opisivali somaklonalno variranje kao rezultat introdukcije, manipulacija i re-

generacije biljaka *in vitro*. Ovaj problem se tako može povezati i sa konzervacijom germplazme na ultra niskim temperaturama. Međutim, neke karakteristike ove tehnologije (npr. blokiranje metabolizma ćelija, manipulacija sa eksplantatima, odnosno odsustvo supkultivisanja) smanjuju rizik za genetičke i epigenetičke promene na minimum. Zbog izlaganja tkiva fizičkom, hemijskom i fiziološkom stresu, a naročito korišćenjem DMSO kao krioprotektanta, koji ima mutageni efekat, u koncentraciji do 10%, mogu uticati na genetsku stabilnost.

Mada su malobrojni radovi koji proučavaju detaljno ove aspekte, činjenica je da ne postoji evidencija o morfološkim, citološkim i genetičkim promenama. Zapažene su neke fenotipske promene u boji, kao i neke albino biljke, ali nema evidencije o promenama citoplazmatičnog i jedarnog porekla, posebno danas kada su na raspolaganju molekularne metode za dokazivanje genetske stabilnosti.

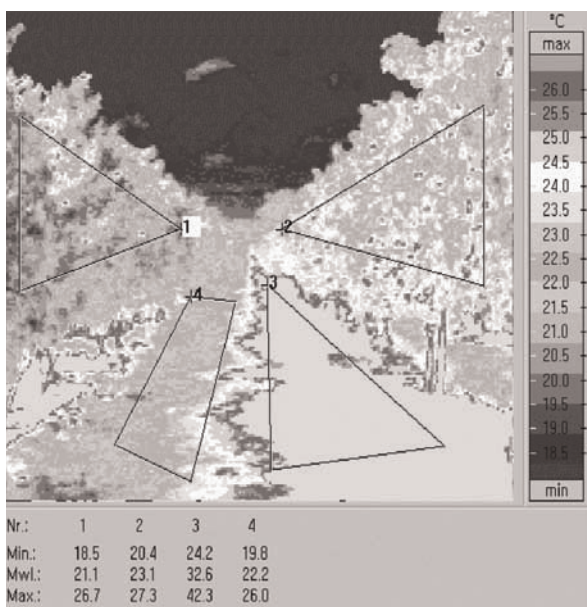
Termografska ispitivanja vinove loze

U radu su prikazani rezultati termografskih ispitivanja listova vinove loze primenom komercijalne infracrve-

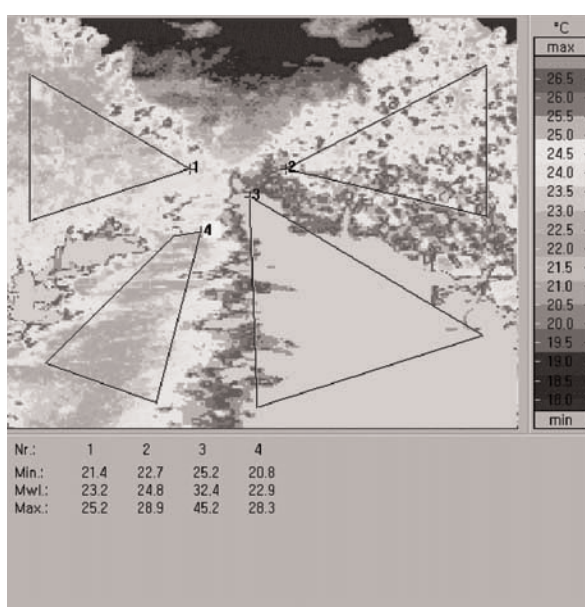
ne kamere VARIOSCAN 2011 i odgovarajućeg softvera (Snap View Pro softver). Ogljed je u toku 2007 god. obavljen sa sortom *Aragonez* na lokalitetu Estremoz koji je ogledno polje Instituta tehnoloških i bioloških nauka, Tehničkog Univerziteta iz Lisabona (Portugal). Termografska merenja su obavljena kod navodnjavanih i biljaka izloženih suši i imala su za cilj da utvrde da li se ovi podaci mogu koristiti za detekciju stepena stresa kome su biljke izložene. Merenja određenih listova u označenim čokotima su obavljena više puta u toku dana uz kalibraciju aparata, a takođe i četiri puta u toku sezone. Rezultati su poređeni sa stepenom otvorenosti stominih ćelija (mereni pomoću porometra).

Istraživanja su deo zajedničkog EU projekta WALTERWEB (FP6-2002-INCO-WBC-509163) saradnje Tehničkog Univerziteta u Lisabonu sa Poljoprivrednim fakultetom u Beogradu.

Termografska *image* analiza je pokazala razlike između listova navodnjavanih biljaka vinove loze, kod kojih preovlađuje paleta plavih i zelenih tonova (Sl. 4) i biljaka koje su bile izložene suši i kod kojih je preovlađujuća crvena i žuta paleta boja (Sl. 5). Na osnovu softverske analize *image* podataka je utvrđeno



Sl. 4. Termografija listova navodnjavanih biljaka vinove loze (Originalne fotografije – Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd)
Fig. 4. Thermography of leaves of irrigated grapevine plants (Original photos – Faculty of Agriculture, Zemun-Belgrade)



Sl. 5. Termografija listova biljaka vinove loze izloženih suši (Originalne fotografije – Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd)
Thermography of leaves of grapevine plants subjected to drought (Original photos – Faculty of Agriculture, Zemun-Belgrade)

da su listovi navodnjavanih biljaka u toku cele sezone bili za prosečno 2°C niži u odnosu na listove biljaka izloženih suši. Merenja provodljivosti stominih ćelija istih listova su pokazala više vrednosti kod navodnjavanih, u odnosu na nenavodnjavane biljke (rezultati nisu prikazani). To ukazuje da se kod navodnjavanih biljaka transpiracija nesmetano odvijala u toku cele ispitivane sezone i da ove biljke nisu bile izložene stresu suše. To je rezultiralo i nižom temperaturom listova u odnosu na nenavodnjavane biljke, kod kojih je suša dovela do zatvaranja stoma i porasta temperature listova.

Ovi rezultati su, slično podacima Jones *et al.* (2002) i Grant *et al.* (2007) takođe pokazali da se tačniji rezultati dobijaju kada se radi *image* analiza u okviru čokota, a ne pojedinačnih listova. To je zbog toga što orijentisanost listova u prostoru i položaj u odnosu na sunčevo zračenje može u značajnoj meri da utiče na temperaturu listova. Generalno su ovi podaci potvrdili da se termografija krošnje može koristiti kao jednostavna, nedestruktivna indirektna metoda za određivanje vodnog statusa i potreba za navodnjavanjem vinove loze.

Vodni potencijal lista – indikator vodnog statusa vinove loze

Vrednosti vodnog potencijal lista predstavljaju pouzdan fiziološki pokazatelj vodnog režima biljke. Chone *et al.* (2001) su detaljno izučavali razlike u izmerenim vrednostima vodnog potencijala lista pred zoru (Ψ_{PD}), vodnog potencijala lista u podne (Ψ_{leaf}) i vodnog potencijala čokota (Ψ_{stem}) na nenavodnjavanim čokotima u vinogradu. Za vodni potencijal lista pred zoru (Ψ_{PD}) se smatra da izražava vodni potencijal biljke kada je vodni fluks biljke jednak nuli i izjednačen je sa vodnim potencijalom korena, a ovaj je u ravnoteži sa zemljišnim vodnim statusom. Autori su ustanovili srednje visoku korelacionu veza između vodnog potencijala u zoru i transpiracionog toka ($r^2 = 0,65$). Vodni potencijal lista u toku dana je pod uticajem velikog broja faktora: zahteva lista za vodom, pristupačnosti vode u zemljištu, stomatalne regulacije, a njegove vrednosti veoma variraju u zavisnosti od mikroklimatskih uslova u kojima se list nalazi u špaliru. Ovaj indikator vodnog statusa nije ukazao na značajnije razlike između čokota u ogledu za razliku od vodnog potencijala čokota (Ψ_{stem}), tako da i nije utvrđena statistički značajna korelaciona veza sa transpiracionim tokom

($r^2 = 0,035$). Vodni potencijal čokota (Ψ_{stem}) ukazuje na efikasnost sprovođenja vode iz zemljišta do atmosfere i autori zaključuju da je veoma pogodan kao rani indikator vodnog deficita kod vinove loze. Korelaciona veza ovog indikatora i transpiracionog toka je visoka ($r^2 = 0,73$).

Vodni potencijal lista pred zoru (Ψ_{PD}) se smatra jednom od najboljih metoda u poljskim uslovima za direktno merenje vodnog statusa biljke. Santesteban *et al.* (2006) su ispitivali razlike između vodnog potencijala pred zoru (Ψ_{PD}), vodnog potencijala lista u podne (Ψ_{leaf}) i vodnog potencijala stabla (Ψ_{stem}) tokom vegetacije kod čokota sa različitim stresom usled suše. Autori su u svojim istraživanjima ustanovili da je Ψ_{PD} bolji indikator u odnosu na Ψ_{leaf} i Ψ_{stem} jer ukazuje na promene i od -0,5 MPa između nenavodnjavanih i navodnjavanih čokota. Rezultati ukazuju da su Ψ_{stem} i Ψ_{leaf} pod velikim uticajem mikroklimatskih uslova u kojima se list nalazi i da je potreban veliki broj listova za njihovo utvrđivanje za razliku od vodnog potencijala pred zoru Ψ_{PD} .

Reakcija vinove loze na deficit vlage – vodni stres i kvalitet grožđa za crvena vina

Vegetativni razvoj vinove loze je pod snažnim uticajem klimatskih uslova i zemljišne vlage. Prisustvo vodnog stresa na početku vegetacionog perioda ima za posledicu smanjen porast lastara u dužinu kao i broj razvijenih zaperaka. Međutim, suvišne količine vode imaju za posledicu bujne špalire, što se, usled smanjene osunčanosti i provetrenosti unutrašnjosti špalira i grozdova, negativno odražava na kvalitet grožđa. Time se dovodi u pitanje sazrevanje grožđa i povećava rizik od gljivičnih oboljenja. Regulisanje vodnog statusa vinove loze omogućava pravilnu izbalansiranost vegetativnog i generativnog razvoja, što je od velikog značaja za kvalitet proizvedenog grožđa (Matthews *et al.*, 1987). Različite tehnike navodnjavanja predstavljaju značajno sredstvo za kontrolu vodnog stresa i bujnosti čokota (Stoll *et al.*, 2000). U uslovima kontrolisanog vodnog deficita obezbeđuju se povoljni mikroklimatski uslovi u zoni grozdova što se pozitivno odražava na kvalitet proizvedenog vinskog grožđa (Matthews i Anderson, 1988; Roby *et al.*, 2004).

Brojna istraživanja uticaja različitih režima vodnog deficita, od zametanja do pune zrelosti, na kvalitet vinskog grožđa i posebno na sintezu fenolnih jedinjenja, sve više zaokupljaju pažnju vinogradara i eno-

loga. Razlog tome je i saznanje da su fenolna jedinjenja vrlo značajne komponente u grožđu i vinu, kojima se pripisuju zdravstveno protektivna svojstva kao i saznanje da sadržaj ovih jedinjenja varira pod uticajem spoljašnjih uslova gajenja. Količina fenola u bobicama je biološko svojstvo sorte i pod uticajem je primenjenih agro- i ampelotehničkih mera, kao i klimatskih uslova. Takođe, veličina bobice indirektno utiče na količinu fenola u širi, jer njihova koncentracija zavisi od odnosa pokožice i mezokarpa bobice (Downey *et al.*, 2006). Obezbeđenost biljke vodom je važan faktor koji utiče na veličinu bobice, a preko nje na koncentraciju i prirodu fenolnih jedinjenja u grožđu i vinu.

Chone *et al.* (2000) ističu da je vodni status biljke važan faktor koji utiče na sadržaj polifenolnih jedinjenja i antocijana u bobicama crvenih vinskih sorti, s obzirom da je visok sadržaj ovih jedinjenja povezan sa srednjim vodnim deficitom biljke. Vodni deficit u periodu od zametanja do šarka (I faza razvoja bobice) izaziva smanjenje konačne mase bobice čak i ako je nakon faze šarka biljci obezbeđen optimalni vodni režim (Matthews *et al.*, 1987; Mc Cartny, 1997). U uslovima vodnog stresa redukuje se veličina bobice, pri čemu se povećava koncentracija polifenola (Sipiora i Gutierrez-Grada, 1998; Esteban *et al.*, 2001). Povećanje koncentracije polifenola je rezultat smanjenja veličine bobice kao i povećanja biosinteze ovih jedinjenja (Esteban *et al.*, 2001). Smanjenje veličine bobice u uslovima vodnog stresa utiče na poromene odnosa pokožica/bobica u korist pokožice. Ovo je veoma značajno sa stanovišta kvaliteta grožđa i vina jer se u pokožici, hipodermalnom sloju, nalaze antocijani i taninska jedinjenja, odgovorni za boju i strukturu crvenih vina.

Ojeda *et al.* (2002) su pratili uticaj različitog stepena vodnog deficita na sintezu i koncentraciju fenolnih jedinjenja u pokožici (tanina, antocijana i flavonola) kod sorte Shyraz. Ustanovljeno je da je biosinteza flavonola veća pri srednje jakom i poznom deficitu vode (III faza razvoja bobice) nego pri ranom, dok je sinteza antocijana izržena samo u poznom deficitu (od šarka do berbe). Ova istraživanja su potvrdila dva načina reagovanja bobice na vodni deficit: prvi je indirektan i uvek pozitivan na koncentraciju fenolnih jedinjenja usled smanjenja veličine bobice i povećanja udela pokožice u masi ploda, a direktan efekat može biti pozitivan i negativan u zavisnosti od vrste fenola, vremena javljanja i intenziteta deficita.

Umereni vodni deficit ($\Psi_{PD} = -0,5 \text{ MPa}$) u periodu od šarka do berbe utiče na povećanje koncentracije flavonola za 100%, sa 0,27 na 0,55 mg/g (Deloire *et al.*, 2005). Takođe, Kennedy *et al.* (2002) su ustanovili da je pri vrednostima vodnog potencijala lista (Ψ_{leaf}) koje su se kretale nakon šarka – pozni deficit, u intervalu od -1,5 do -1,7 MPa, sadržaj antocijana iznosio 0,822 mg/g, a katehina 2,81 mg/g. Kod biljaka kod kojih je vodni potencijal lista bio u intervalu od -1,0 do -1,4 MPa, sadržaj antocijana je iznosio 0,635 mg/g, a katehina 2,02 mg/g.

Pri umerenom i poznom vodnom deficitu (III faza razvoja bobice), povećava se stepen polimerizacije fenola i na taj način poboljšavaju senzorne karakteristike crvenih vina (Sivilotti *et al.*, 2005). Pri različitim tretmanima navodnjavanja i različitig stepena obezbeđenosti čokota vodom sorte Kaberne Sovinjon, utvrđeno je da su u vinima iz tretmana sa standardnim navodnjavanjem i optimalnim vodnim režimom čokota (100% od Et) dominirale vegetativne arome i izraženiја trpkost na ukusu. U tretmanima gde su čokoti bili izloženi stresu suše (vrednosti vodnog potencijala lista do -1,6 MPa), u vinima su dominirale voćne arome – crvena i crna ribizla, arome sušenog voća (Chapman *et al.*, 2005).

Zaključak

Progres koji je načinjen u oblasti tehnologije konzervacije *in vitro* je impresivan i doprinosi značajno očuvanju biljnog diverziteta. Sporo hlađenje koje je 70' godina uvedeno za dugo čuvanje biljnog tkiva nije našlo širu primenu uglavnom zbog kompleksnosti metode i visoke cene krio-zamrzivača. Ranih 90' godina sa razvojem jednostavnijih protokola za kriokonzervaciju, baziranih na sprečavanju stvaranja intra i extra-celularnih kristala leda putem ćelijske vitifikacije i direktnim potapanjem eksplantata u LN, krio-čuvanje genetičkih resursa postaje realnost za mnoge vrste biljaka.

Dalja istraživanja bi trebala biti usmerena na usavršavanje procedura, kako bi ove biotehnologije postale dostupne širokom spektru javnih ustanova i korisnika, ali razviti i svest o značaju očuvanja dragocene germplazme.

Poseban doprinos u rešavanju problema dejstva stresnih faktora na biljke mogle bi da daju *image* metode, a koje predstavljaju praktičnu primenu teorijskih

znanja iz fiziologije biljaka. To bi po Chaerle-u et al. (2007) moglo dovesti i do stvaranja tzv. „kataloga stresa“ za gajene biljke koji bi omogućili da se ovim nedestruktivnim i jednostavnim metodama lako prepoznaju simptomi stresa, posebno u ranim fazama, i da se oni potom efikasno uklone. Primena u našim uslovima ovih metoda, i posebno korišćenje dostupnih satelitskih informacija, doprinela bi smanjenju negativnih efekata, posebno suše, na prinos i kvalitet voćarskih kultura i vinove loze.

Uslovi obezbeđenosti čokota vodom predstavljaju ključni faktor *terroir* efekta na kvalitetni potencijal grožđa i vina jer obuhvataju osnovne faktore *terroir-a* i njihovu interakciju – klima, zemljište, sorta (Van Leeuwen i Seguini, 2006).

U uslovima vodnog deficita dolazi do promena u strukturi i hemijskom sastavu bobice. Umanjuje se vegetativni porast što doprinosi optimalnijem odnosu lišna površina/prinos i boljim mikroklimatskim uslovima u zoni grozdova. Prisustvo umerenog vodnog deficita kod crvenih vinskih sorti ispoljava pozitivan uticaj na kvalitet proizvedenog grožđa i vina. Smanjuje se masa bobice i povećava udeo pokožice u ukupnoj masi ploda, kao i koncentracija fenolnih jedinjenja.

Deficit vlage posle šarka, III faza, povećava stepen polimerizacije fenola čime se poboljšavaju senzorne karakteristike vina. Senzorne analize crvenih vina ukazuju na intenzivnije prisustvo voćnih aroma u uslovima poznog vodnog deficita.

Navedeni efekti vodnog deficita – određenog intenziteta i vremena pojave, na izbalansiranost vegetativne mase i prinosa kao i hemijski sastav grožđa, povećavaju enološki potencijal grožđa za spravljanje crvenih vina visokog kvaliteta.

U kom stepenu su promene u hemijskom sastavu grožđa i vina posledica direktnih promena u metabolizmu ovih jedinjenja u bobici, a u kom rezultat indirektnih efekata vezanih za umanjen vegetativni porast i izmenjene mikroklimatske uslove u špaliru, još uvek nije u potpunosti razjašnjeno. Ova, još uvek nedovoljno jasna pitanja privlače pažnju i predmet su istraživanja u vinogradarskim zemljama širom sveta.

Predstavljena teorijska saznanja, kao i nove metode za determinaciju značajnih fizioloških procesa u biljci već nalaze široku primenu u mnogim razvijenim zemljama sveta i tako doprinose povećanju proizvodnje, ali i podizanju kvaliteta plodova voćaka i vinove loze.

Literatura

- Adriani M., Piccioni E., Standardi A. (2000): Effect of different treatments on the conversion of Hayward kiwifruit synthetic seeds to whole plants following encapsulation of *in vitro* derived buds. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28: 59–67.
- Altman A. (1999): Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. *Plant Biotechnology*, 2, 2: 1–6.
- Barbagallo R.P., Oxborough K., Pallett K.E., Baker N.R. (2003): Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology*, 132: 485–493.
- Berger S., Benediktyova Z., Matous K., Benfig K., Mueller M.J., Medbal L., Roitsch T. (2007): Visualization of dynamics of plant – pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 58: 797–806.
- Borkowska B. (1986): Dormancy of micropropagated sour cherry plantlets. *Tree Physiology*, 1: 303–307.
- Borkowska B. (1990): Influence of low temperature storage on regenerative capacity of sour cherry cultures. *Fruit Science Report*, 17(1): 1–7.
- Brishia R., Piccioni E., Standardi A. (2002): Micropropagation and synthetic seed in M.26 apple rootstock (II): A new protocol for production of encapsulated differentiating propagules. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 137–141.
- Bulanon D.M., Burks T.F., Alchanatis V. (2008): Study on temporal variation in citrus canopy using thermal imaging for citrus fruit detection. *Biosystems Engineering*, 101: 161–171.
- Chaerle L., Leinonen I., Jones H.G., Van Der Straeten D. (2007): Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *Journal of Experimental Biology*, 58: 807–814.
- Chapman D., Roby G., Ebeler S., Guinard J.X., Matthews M. (2005): Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different water status. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 339–347.
- Chone X., Leeuwen C., Dubourdieu D., Gaudilleres J.P. (2001): Stem water potential is a sensitive indicator of grapevine water status. *Annals of Botany*, 87: 477–483.
- Chone X., Tregoat O., Van Leeuwen C., Dubourdieu D. (2000): Vine water deficit: Among the 3 applications of pressure chamber, stem water potential is the most sensitive indicator. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, 34, 4: 169–176.
- De Carlo L.L., Benelli C., Lambardi M. (2000): Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) cryopreservation. *CryoLetters*, 21: 215–222.
- Deloire A., Ojeda H., Zebic O., Bernard N., Hunter J.J., Carbonneau A. (2005): Influence de l'état hydrique de la vigne sur le style de vin. *Le Progrès Agricole et Viticole*, 122, 21: 455–462.
- Dereuddre J., Scottez C., Arnaud X., Duron M. (1990): Resistance of alginate – coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv Beurre hardy) *in vitro* shoots to dehydration

- and subsequent freezing in liquid nitrogen. C R Academie des Sciences, Paris, Serie III, 310, pp. 317–323.
- Downey M.O., Dokoozlian N.K., Krstic M.P. (2006): Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57: 257–268
- Duteau J., Guilloux M., Sequin G. (1981): Influence des facteurs naturels sur la maturation du raisin eu 1979, a Pomerol et Saint Emilion. *Connaissances de la Vigne et du Vin.*, 15: 1–27.
- Esteban M.A., Villaneuva M.J., Lissarrague J.R. (2001): Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal Sci. Food Agric.*, 81: 409–420.
- Fuchs M. (1990): Infrared measurement of canopy temperature and detection of plant water stress. *Theoretical and Applied Climatology*, 42: 253–261.
- Grant O.M., Tronina L., Jones H.G., Chaves M.M. (2007): Exploring thermal imaging variables for the detection of stress responses in grapevine under different irrigation regimes. *Journal of Experimental Biology*, 58: 815–825.
- Guiliani R., Flore J.A. (2000): Potential use of infra-red thermometry for the detection of water stress in apple trees. *Acta Horticulturae*, 537: 383–392.
- <http://www.alpacas.com/AlpacaLibrary/GlossaryAC.aspx>
- <http://www.biw.kuleuven.be/dtp/tro/cost871/Home.htm>
- <http://www.new-agri.co.uk/05-1/develop/dev03.html>
- IBPGR (1983): IBPGR Advisory Committee on *in Vitro* Storage: Report of the First Meeting. International Board For Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- Janero L.V., Vieitez A.M., Ballester A. (1995): Cold storage of *in vitro* cultures of wild cherry, chestnut and oak. *Annals Sci. For.*, 52: 287–293.
- Jones H.G. (2004 b): Irrigation scheduling: advantages and pitfalls of plant-based methods. *Journal of Experimental Botany*, 55: 2427–2436.
- Jones H.G. (2004a): Application of thermal imaging and infrared sensing in plant physiology and ecophysiology. *Advances in Botanical Research*, 41: 107–163.
- Jones H.G. (2007): Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2: 119–130.
- Jones H.G., Stoll M., Santos T., Sousa C., Chaves M.M., Grant O.M. (2002): Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2249–2260.
- Jouve L., Franck D., Gaspar T., Cattivelli L., Hausman J.F. (2000): Poplar acclimation to cold during *in vitro* conservation at low non-freezing temperature: metabolic and proteic changes. *Journal Plant Physiology*, 157: 117–123.
- Kaminuma E., Heida N., Tsumoto Y., Yamamoto N., Goto N., Okamoto N., Konagaya A., Matsui M., Toyoda T. (2004): Automatic quantification of morphological traits via three-dimensional measurement of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 38: 358–365.
- Kempler C., Kabaluk J.T., Toivonen M.A. (1992): Effect of environment and harvest date on maturation and ripening of kiwifruit in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Science*, 72: 863–869.
- Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse A.L. (2002): Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53: 268–274.
- Kovalchuk I., Reed B. (2004): *In vitro* cold storage: a reliable method of stone fruit germplasm preservation. *Proceeding International Scientific Conference. The strategy of Scientific Ensuring of Horticulture, Reality and Perspectives.* Almaty Agricultural University, pp. 136–140.
- Krause G.H., Weis E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 313–349.
- Lambardi M., De Carlo A. (2003): Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: 'Micropropagation of woody trees and fruits'. Jain S.M. & Ishii K. (eds.). Kluwer Academic Publishers, pp. 815–840.
- Lenk S., Chaerle L., Pfundel E., Langsdorf G., Hagenbeek D., Lichtenthaler H.K., Van Der Straeten D., Buschmann C. (2007): Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. *Journal of Experimental Biology*, 58: 773–784.
- Leva A.R., Amato F., Benelli A., Goretti R. (1992): La conservazione *in vitro* di cultivar di pero e pesco. *Informatore Agrario*, 13: 135–183.
- Lichtenthaler H.K., Langsdorf G., Lenk S., Buschmann C. (2005): Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica*, 43: 355–369.
- Lisek A., Orlikowska T. (2004): *In vitro* storage of strawberry and raspberry in calcium-alginate beads at 4°C. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78: 167–172.
- Mahan J.R., Burke J.J., Upchurch D.R., Wanjura D.F. (2000): Irrigation scheduling using biologically-based optimal temperature and continuous monitoring of canopy temperature. *Acta Horticulturae*, 537: 375–381.
- Marino G. (1997): Application and limitations of conserving *in vitro* cultures of *Prunus*. In: 'Conservation of Plant Genetic Resources *in vitro*'. Razdan MK & Cocking EC (eds.). Science Publishers, Inc. USA, pp. 225–242.
- Matthews M.A., Anderson M.M., Schultz H.T. (1987): Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet franc. *Vitis*, 26: 147–160.
- Matthews M.A., Anderson M.M. (1988): Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: Responses to seasonal water deficits. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39: 313–320.
- McCarthy M.G. (1997): The effect of transient water deficit on berry development of cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.*, 3: 102–108.
- Ojeda H., Andary C., Creaba E., Carbonneau A., Deloire A. (2002): Influence of pre- and postveraison water deficit on sintesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54, 4: 261–267.
- Panis B., Lambardi M. (2005): Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). *Book of Proceedings International Workshop The role of biotechnology for the characterisation and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources*, Turin, Italy, pp. 43–54.
- Paul H., Daigny G., Sangwan-Norreel B.S. (2000): Cryopreservati-

- on of apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. Plant Cell Report, 19: 768–774.
- Petrevica L., Bite A. (2003): The influence of short-term cold storage on the cherry microshoot proliferation. Acta Horticulturae, 616: 327–330.
- Popescu A., Coman M., Mladin P., Isac V. (2004): *In vitro* storage of berry genotypes. Acta Horticulturae, 649: 111–114.
- Reed B.M. (1992): Cold storage of strawberries *in vitro*: a comparison of three storage system. Fruit Varieties Journal, 46: 98–102.
- Roby G., Harbertson J.F., Douglas a.a., Matthews M. (2004): Berry size and water deficit as factor in winegrape composition: anthocyanins and tannins. Australian Journal of Grape and Wine Research, 10: 100–107.
- Ružić Đ., Cerović R. (1990): Proliferazione *in vitro* della cv di susino Požegača dopo conservazione frigorifera. Rivista di Frutticoltura, 3: 81–82.
- Ružić Đ., Cerović R. (1999): The evaluation of *in vitro* shoot cultures of two sweet cherry rootstocks after cold storage. Journal Fruit Ornamental Plant Research, VII, 4: 153–162.
- Ružić Đ., Ličina V., Stikić R., Cerović R., Vulić T., Ruml M. (2005): Novi pravci istraživanja u fiziologiji i ekologiji voćaka. Voćarstvo, 39, 152: 401–429.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2008): *In vitro* methods used in preservation of fruit germplasm in Serbia. Cryopreservation of crop species in Europe, Cryoplanet COST Action 871, Workshop, Oulu, Finland, pp. 56–57.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. (1990): Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Report, 9: 30–33.
- Santesteban L.G., Royo J.B. (2006): Water status, leaf area and fruit load influence on berry weight and sugar accumulation of cv. Tempranillo under semiarid conditions. Scientia Horticulturae, 109: 60–65.
- Sepulcre-Cantó G., Zarco-Tejada P.J., Jiménez-Muñoz J.C., Sobrino J.A., Soriano M.A., Fereres E., Vega V., Pastor M. (2007): Monitoring yield and fruit quality parameters in open-canopy tree crops under water stress. Implications for ASTER Remote Sensing of Environment, 107: 455–470.
- Sipiora M.J., Gutierrez-Granda M.J. (1998): Effects of preveraison irrigation cutoff and skin contact time on the composition, color and phenolic content of young Cabernet Sauvignon wines in Spain. Am. J. Enol. Vitic., 49: 152–162.
- Sivilotti P., Bonetto C., Paladin M., Peterlunger E. (2005): Effect of soil moisture availability on Merlot: From leaf water potential to grape composition. American Journal of Enology and Viticulture, 56, 1: 9–18.
- Slatyer R.O., Taylor S.A. (1960): Terminology in plant-soil-water relationship. Nature, 187: 922–924.
- Smillie R.M., Hetherington S.E., Nott R., Chaplin G.R., Wade N.L. (1987): Application of chlorophyll fluorescence to the post-harvest physiology and storage of mango and banana fruit and the chilling tolerance of mango cultivars. Asian Food Journal, 3: 55–59.
- Son S.H., Chun Y., Hall R.B. (2004): Cold storage of *in vitro* cultures of hybrid poplar shoots (*Populus alba* x *P. grandidentata* Michx.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27, 2: 161–168.
- Stajanko D., Lakota M., Hocevar M. (2004): Estimation of number and diameter of apple fruits in an orchard during the growing season by thermal imaging. Computers and Electronics in Agriculture, 42: 31–42.
- Stoll M., Loveys B.R., Dry P.R. (2000): Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. Journal of Experimental Botany, 51: 1627–1634.
- Tregouat O., Gaudillere J., Chone X., Leeuwen C. (2002): Etude du regime hydrique et de la nutrition azotee de la vigne par des indicateurs physiologiques. Influence sur la comportement de la vigne et la maturation du raisin *V. vinifera* L. cv. Merlot, 2000, Bordeaux. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 36: 133–142.
- Tsvetkov I., Hausman J.F. (2005): *In vitro* regeneration from alginate-encapsulated microcuttings of *Quercus* sp. Scientia Horticulturae, 103, 4: 503–507.
- Van Leeuwen C., Sequin G. (2006): The Concept of terroir in Viticulture. Journal of Wine Recherche, 17, 1: 1–10.
- Verstraeten W.W., Veroustraete F., van der Sande C.J., Grootaers L., Feyen J. (2006): Soil moisture retrieval using thermal inertia, determined with visible and thermal spaceborne data, validated for European forests. Remote Sensing of Environment, 101: 299–314.
- Walter A., Schurr U. (2005): Dynamics of leaf and root growth: endogenous control versus environmental impact. Annals of Botany, 95: 891–900.
- West T., Ravindra M.B., Preece J.E. (2006): Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 87, 3: 223–231.
- Whiters L.A., Engelmann F. (1997): *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: 'Biotechnology in Agriculture'. Altman A. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York.
- Wilkins C.P., Newbury H.J., Doods J.J. (1988): Tissue culture conservation of fruit trees. PGR Newsletter, 73/74: 9–20.

THE APPLICATION OF MODERN THEORETICAL INNOVATIONS IN THE FIELD OF PHYSIOLOGY AND ECOLOGY OF FRUITS AND GRAPEVINES**Djurdjina Ružić¹, Radmila Stikić², Slavica Todić², Milovan Veličković²**¹*Fruit Research Institute, 32000 Čačak, Kralja Petra I 9, Serbia**E-mail: jugvocca@yu1.net*²*Faculty of Agriculture, 11080 Zemun, Nemanjina 6, Serbia***Abstract**

The latest innovations in the field of physiology and ecology of fruits and grapevines are currently being intensively applied in practice. It is of utmost importance to harmonize environmental factors and biological requirements of cultivated fruit and grapevine species/cultivars, which targets at high productivity and superior quality of fruits.

Practical application of newly acquired knowledge in the field of biology, which is a general definition covered by 'biotechnologies', will be presented in the paper which includes the latest *in vitro* preservation techniques that appear to be indispensable modes in modern global repositories of plant gene pools.

Actual global warming affects both life on our planet and climate change. Water contained in soil, atmosphere, plant tissues and organs is the crucial factor of survival of all living systems, fruits and grapevines accordingly. Any deviation from optimal

water content leads to the disorder in the performance of physiological processes in a plant organism over long periods of drought, nonetheless the incidence of plant wilting or dieback of trees in full cropping are the accompanying effects of water shortages.

Physiological indicators of drought-induced stress and consequences of water deficiencies on grapevine, will be presented in this paper along with modern image technologies, i.e. fluorescence, multi-spectral reflection and thermography based on the human knowledge of physiological processes in plants. These simple and nondestructive methods are widely used in optimizing irrigation, measuring the resistance of plants to abiotic and biotic stress factors and in the analyses of yield quantity and quality.

Key words: biotechnologies, *in vitro* plant gene pool, water stress, phenol compounds, image technologies, thermography