

Univerzitet u Sarajevu
Poljoprivredno-prehrambeni fakultet
Gen banka

SOP 1/25: KULTURA TKIVA ZA PROIZVODNJU ELITNOG SADNOG MATERIJALA KROMPIRA

Jasmin Grahić

SADRŽAJ

STANDARDNA OPERATIVNA PROCEDURA.....	3
UVOD.....	5
METODE I MATERIJALI.....	7
Detaljan opis svih materijala potrebnih za proces mikropropagacije	7
Karakteristike medija za kulturu, ostalih hemikalija i laboratorijske opreme	8
Hranjivi medij	8
Laboratorijska oprema	9
Instrumenti i potrošni materijal	9
Hemijski reagensi	9
Sterilni uvjeti	9
Izvor svjetlosti	10
Oprema za dokumentaciju i praćenje	10
PRIPREMA HRANJIVOG MEDIJA	11
FAZE PROCESA.....	12
Pretretman - termoterapija i opcionalna hemoterapija	12
Sterilizacija klica i ekscizija meristema	12
Multiplikacija izdanaka	12
Ukorjenjivanje	13
Aklimatizacija (<i>ex vitro</i>)	13
KONTROLA KVALITETE I VIROLOŠKI NADZOR	14
Virološki panel i učestalost testiranja.....	14
Kriteriji prihvatanja i otpisa	14
Sterilnost i kontrola kontaminacija	14
DOKUMENTACIJA I SLJEDIVOST.....	16
SIGURNOST I BIOSIGURNOST	17
KRITERIJI USPJEHA I TIPIČNI ISHODI	18
HISTORIJA REVIZIJE DOKUMENTA	19

STANDARDNA OPERATIVNA PROCEDURA

SOP br.	AUTOR/I	DATUM KREIRANJA
1/25	Jasmin Grahić, Mirha Đikić, Drena Gadžo, Arnela Okić, Merim Halilović, Ajdin Avdović	01. 09. 2025. godine

NAZIV PROCEDURE
KULTURA TKIVA ZA PROIZVODNJU ELITNOG SADNOG MATERIJALA KROMPIRA

NAMJENA	Namjena predloženog dokumenta je uspostavljanje procedure za proizvodnju elitnog sadnog materijala krompira upotrebom kulture tkiva.
PODRUČJE PRIMJENE	Predloženi SOP 1/25 se primjenjuje u sklopu Gen banke Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu pri provođenju postupka kulture tkiva nad biljnim materijalom krompira. SOP 1/25 opisuje postupke pripreme, inicijacije kulture, multiplikacije, ukorjenjavanja i aklimatizacije propaganata.

DATUM ODOBRENJA DOKUMENTA:	
VERZIJA:	Ver. 1.0 (inicijalni dokument)
ODGOVORNO LICE ZA SOP:	Prof. dr Jasmin Grahić
ODOBRENO OD:	Odgovorno lice za Laboratorij za mikropropagaciju: Prof. dr Jasmin Grahić
	Odgovorno lice za Gen banku Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta: Prof. dr Jasmin Grahić

	
--	-------

POVEZANI DOKUMENTI

SOP 1/25 je povezan sa internim dokumentima Gen Banke PPF:

- SOP 2/25: Indeksiranje virusa krompira pri postupku kulture tkiva (Ver. 1.0)
- SOP 3/25: Proizvodnju elitnog sadnog materijala – mini tubera krompira u aeroponskom sistemu (Ver. 1.0) .

REFERENTNI DOKUMENTI

Lista referentnih dokumenata koji mogu pomoci u razumijevanju ovog SOPa:

UVOD

Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (FAO), u publikaciji *Agricultural Production Statistics 2010–2023*, globalna proizvodnja krompira u posmatranom periodu iznosila je približno 383 miliona tona, pri čemu se zemlje Evropske unije zajednički izdvajaju sa oko 48,3 miliona tona godišnje proizvodnje.

U istom referentnom periodu, zvanična statistika Agencije za statistiku Bosne i Hercegovine pokazuje da je prosječna godišnja požnjevena površina pod krompirom iznosila 19.666 ha, uz prosječan prinos od oko 14,55 t/ha, što odgovara ukupnoj proizvodnji od približno 286.000 tona. Podaci Svjetske banke (WITS) i UN Comtrade baze pokazuju da je Bosna i Hercegovina u 2023. godini uvezla 9.676.200 kg (≈ 9,68 hiljada tona) sjemenskog krompira. Iako tokom 2023. godine nije zabilježena službena zabrana uvoza koja bi bila uzrokovana detekcijom zaraženog sjemenskog materijala, u 2025. godini su zabranjene dvije pošiljke ukupne mase 84,95 tona, što dodatno ukazuje na postojeće rizike u pogledu fitosanitarne ispravnosti uvoznog sjemenskog materijala.

Četiri virusa koja su ekonomski najznačajnija u globalnoj proizvodnji krompira, a istovremeno predstavljaju i ključne fitosanitarne izazove u Bosni i Hercegovini, jesu:

- 1. *Potato virus Y* (PVY);
- 2. *Potato leafroll virus* (PLRV);
- 3. *Potato virus X* (PVX);
- 4. *Potato virus S* (PVS).

Ovi virusi uzrokuju kompleksna fiziološka i morfološka oštećenja biljaka krompira, dovodeći do značajnih gubitaka prinosa, pogoršanja kvaliteta krtola i ubrzane degeneracije sadnog materijala. Zbog njihove visoke učestalosti, velike genetske varijabilnosti i različitih mehanizama prenosa, smatraju se jednim od najkritičnijih ograničavajućih faktora u sistemima sjemenske i merkantilne proizvodnje krompira.

U nastavku su sumirane najvažnije karakteristike svakog od ova četiri virusa.

Virus	Glavni problem	Prosječan gubitak prinosa	Napomena
PVY	Nekroze, mozaici, tuber ringspot, visoka varijabilnost, sinergizam s PVX	10–80 %	Najvažniji virus krompira globalno
PLRV	Uvijanje lišća, mali gomolji, floem-limitiran	50–90 %	Najteže se eradikuje
PVX	Latentna infekcija, snažan sinergizam s PVY	10–20 % (solo), > 80 % (PVY+PVX)	Veoma stabilan, mehanički prenos
PVS	Latentna infekcija, smanjeni prinos	10–20 %	Najrašireniji virus krompira

Procentualni raspon gubitaka prinosa prikazan u tabeli odražava tipičan utjecaj pojedinačnih infekcija u standardnim agroekološkim uslovima. Posebno je važno naglasiti da prisustvo dva ili više virusa

istovremeno (koinfekcija) gotovo uvijek dovodi do drastičnog pada prinosa, pri čemu se registruju slučajevi:

- ekstremne redukcije ukupnog prinosa;
- izrazito slabog skladišnog kvaliteta;
- potpune neisplativosti proizvodnje;
- a u najtežim slučajevima i potpunog izostanka formiranja krtola.

Sinergistički efekti, posebno između PVY i PVX, predstavljaju jedan od najopasnijih oblika virološkog stresa u krompiru, jer takva kombinacija dovodi do eksponencijalno povećane virusne akumulacije i teških nekrotičnih simptoma.

Virusne infekcije krompira (najčešće PVY, PLRV, PVX i PVS) ne mogu se liječiti direktno hemijskim sredstvima u polju. „Izliječenje“ se stoga provodi isključivo u laboratorijskim uslovima, primjenom biotehnoloških postupaka kojima se iz zaraženog genotipa dobijaju bezvirusne biljne jedinice.

In vitro regeneracija predstavlja jednu od najefikasnijih biotehnoloških strategija za dobivanje bezvirusnih biljaka namijenjenih daljnjoj vegetativnoj reprodukciji. Dosadašnja istraživanja pokazuju da je kultura meristema temeljna metoda eradikacije virusa, budući da meristematsko tkivo često ostaje nepogođeno virusnom infekcijom zahvaljujući brzom diobi ćelija i odsustvu diferenciranih floemskih elemenata. Međutim, mnogi biljni virusi – posebno oni prisutni u krompiru, poput PVY, PLRV, PVX i PVS – pokazuju izrazitu stabilnost, visoku adaptibilnost i sposobnost kolonizacije različitih tkiva, što značajno umanjuje efikasnost samostalne meristem kulture. Zbog toga je postalo neophodno razviti kombinovane, integrirane protokole koji udružuju više eradikacijskih postupaka.

U međunarodnoj praksi najuspješnijim se pokazala kombinacija kulture meristema i termoterapije. Termoterapija smanjuje virusnu titru, ograničava kretanje virusa prema meristemu i povećava vjerovatnoću da će meristem ostati bez infekcije, dok ekscizija i *in vitro* regeneracija meristema omogućavaju dobijanje novih biljaka koje potiču iz malog broja ćelija, čime se šanse za virusno oslobađanje dodatno povećavaju. Ovaj kombinovani pristup trenutno predstavlja standardnu metodu u većini globalnih programa za proizvodnju bezvirusnog sjemenskog krompira, te čini osnovu modernih protokola certifikacijske i pre-bazne proizvodnje.

METODE I MATERIJALI

Detaljan opis svih materijala potrebnih za proces mikropropagacije

Za uspješnu mikropropagaciju krompira, neophodno je osigurati visokokvalitetne materijale koji zadovoljavaju standarde laboratorijskog rada. Detaljan popis uključuje:

- biljni material - eksplantati: meristem iz klice.
- Eksplantati moraju biti zdravi i bez vidljivih znakova oštećenja ili infekcija;
- hranjivi mediji:
 - osnovni hranjivi medij Murashige i Skoog (MS) s odgovarajućim koncentracijama makro- i mikronutrijenata;
 - dodaci:
 - saha ili druga metabolički dostupna glukoza/sukroza (2-3 %);
 - biljni hormoni - citokinini (npr. kinetin, 6-benzilaminopurin - BAP), auksini (npr. indol-3-octena kiselina - IAA, naftalenoctena kiselina - NAA), giberelini po potrebi;
 - aktivni ugljen (za adsorpciju fenola u nekim formulacijama);
 - agar ili gelan-gum za očvršćivanje medija;
 - pH regulator: Rastvor NaOH ili HCl za podešavanje pH na optimalnih 5,6-5,8;
- laboratorijska oprema:
 - laminarni protok zraka za sterilne uvjete;
 - autoklav za sterilizaciju medija, instrumenata i posuda;
 - inkubatori ili komore za kultivaciju s kontrolom temperature (24–27 °C), svjetlosti (fotoperiod 16 sati svjetla) i vlažnosti;
 - sterilne posude za kultivaciju:
 - staklene ili plastične Petrijeve posude;
 - Erlenmeyer tikvice ili cijevi za uzgoj biljaka;
- instrumenti i potrošni materijal:
 - skalpel, pincete, makaze – sterilizirani prije svake upotrebe;
 - sterilne pipete i vrhovi za pipete;
 - sterilne rukavice, maske i zaštitna odjeća za osoblje;
 - sterilni filteri i membrane (za sterilizaciju osjetljivih dodataka poput vitamina);
- hemijski reagensi:
 - sterilni vitamini: tiamin, piridoksin, nikotinska kiselina;
 - aminokiseline: glutamin ili prolin (po potrebi);
 - fungicidi ili antibiotici (ako je potrebno za suzbijanje kontaminacije);

- sterilni uslovi:
 - o alkohol (70 % izopropanol ili etanol) za dezinfekciju radnog prostora i instrumenata;
 - o hipokloritni rastvori (5-10 %) za sterilizaciju eksplanata;
 - o Tween-20 ili slični tenzidi za poboljšanje dezinfekcije;
- izvor svjetlosti
 - o LED lampe s optimalnim spektrom za rast biljaka;
- oprema za dokumentaciju i praćenje:
 - o digitalna vaga za precizno mjerenje sastojaka;
 - o pH metar za podešavanje pH medija;
 - o kamera ili mikroskop za praćenje razvoja biljaka;

Ovi materijali će osigurati optimalne laboratorijske uvjete neophodne za uspješnu mikropropagaciju, čime se postavlja temelj za masovnu i isplativu proizvodnju kvalitetnih biljaka u rasadniku Plant d.o.o. Tuzla.

Karakteristike medija za kulturu, ostalih hemikalija i laboratorijske opreme

Hranjivi medij

Murashige i Skoog (MS) medij se koristi kao standardni osnovni hranjivi medij za mikropropagaciju. Medij mora sadržavati precizno definirane koncentracije makronutrijenata (azot - N, fosfor - P, kalij - K, kalcij - Ca, magnezij - Mg) i mikronutrijenata (željezo - Fe, mangan - Mn, cink - Zn, bakar - Cu, bor - B, molibden - Mo). Također uključuje vitaminski kompleks (tiamin, piridoksin, nikotinska kiselina). Koncentracija medija može biti razrijeđena (1/2 ili 1/3) za specifične faze rasta kako bi se smanjila toksičnost nutrijenata. MS medij je dostupan kao prašak, koji se razrjeđuje destiliranom vodom.

Kako bi se ostvario željeni efekat, neophodno je koristiti sljedeće dodatke hranjivim medijima:

- sukroza - koristi se kao izvor ugljika za metabolizam biljaka. Sukroza mora biti farmaceutske čistoće, u koncentraciji od 20-30 g/L. Alternativno, može se koristiti glukoza iste čistoće.
- biljni hormoni:
 - o Citokinini - Kinetin ili 6-benzilaminopurin (BAP) visokog standarda čistoće (> 98 %) u koncentracijama od 0.5-2 mg/L. Ovi hormoni stimuliraju razvoj pupoljaka;
 - o Auksini - Indol-3-octena kiselina (IAA) ili naftalenoctena kiselina (NAA) farmaceutske čistoće, u koncentracijama od 0.1-0.5 mg/L, podstiču razvoj korijena i elongaciju;
 - o Giberelini - Giberelinska kiselina (GA₃), po potrebi, koristi se za elongaciju biljaka u specifičnim fazama razvoja (po potrebi);
- aktivni ugljen - mikrogranularni ugljen visoke adsorpcione moći, koristi se u koncentraciji od 1-2 g/L za uklanjanje fenolnih spojeva koji mogu inhibirati rast biljaka;

- agar ili gelan-gum - agar mora biti visoke čistoće, niske temperature topljenja (oko 40 °C) i bistre konzistencije. Koristi se u koncentraciji od 8 g/L. Gelan-gum, alternativni očvršćivač, koristi se u koncentraciji od 2-3 g/L;
- pH regulator - rastvor natrijevog hidroksida (NaOH) ili hlorovodične kiseline (HCl) koncentracije 1 M koristi se za precizno podešavanje pH medija na optimalnih 5.6-5.8 prije sterilizacije.

Laboratorijska oprema

Laminarni protok zraka mora biti kabinet klase II s HEPA filterom efikasnosti 99,99 % za čestice $\geq 0,3 \mu\text{m}$. Dimenzije kabineta trebaju biti dovoljne za smještaj opreme (minimalno 120 cm širine). Integrisano LED osvjetljenje i UV lampa za sterilizaciju su neophodni.

Vertikalni ili horizontalni autoklav s kapacitetom od najmanje 20 L. Sterilizacijski ciklus mora osigurati temperaturu od 121 °C pri pritisku od 1 atm. Digitalni kontroler s automatskim hlađenjem i sigurnosnim ventilom je obavezan.

Komore moraju imati preciznu kontrolu temperature ($\pm 0,5$ °C), s mogućnošću podešavanja od 24 do 27 °C. Vlažnost treba biti prilagodljiva u rasponu od 60-80 %, dok svjetlosni režim mora uključivati fotoperiod od 16 sati svjetla dnevno. Osvjetljenje pružaju LED lampe s intenzitetom svjetlosti od 50-100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Sterilne posude za kultivaciju - staklene Petrijeve posude (100 mm $\times$ 15 mm) moraju biti izrađene od borosilikatnog stakla otporne na autoklaviranje. Alternativno, plastične posude od polikarbonata s čvrstim poklopcima su prihvatljive. Erlenmeyer tikvice kapaciteta 100-250 mL i sterilne cijevi (15-50 mL) također su potrebne.

Instrumenti i potrošni materijal

Skalpeli, pincete i makaze izrađeni od medicinskog nehrđajućeg čelika moraju biti otporni na koroziju i autoklaviranje. Pipete s promjenjivim volumenom (0.1-10 mL) trebaju biti kompatibilne sa sterilnim vrhovima. Rukavice od nitrila, sterilne maske i zaštitna odjeća moraju zadovoljiti standarde za laboratorijski rad.

Hemijski reagensi

Vitamini, poput tiamina, piridoksina i nikotinske kiseline, moraju biti farmaceutske čistoće (> 98 %) i u sterilnom obliku. Aminokiseline, poput glutamina i prolina, koriste se prema potrebama biljnih tkiva. Antibiotici, poput gentamicina, mogu se dodati mediju za sprječavanje kontaminacije.

Sterilni uvjeti

Izopropanol (70 %) mora biti farmaceutske čistoće za dezinfekciju instrumenata i radne površine. Hipokloritni rastvori (5-10 %) koriste se za sterilizaciju eksplanata, uz dodatak Tween-20 za poboljšanje penetracije.

Izvor svjetlosti

LED lampe s punim spektrom svjetlosti (400-700 nm) i intenzitetom od 50-100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ su optimalne za fotosintezu biljaka. Lampe trebaju imati dug vijek trajanja (>20,000 sati).

Oprema za dokumentaciju i praćenje

Digitalna vaga s preciznošću od 0,001 g omogućava precizno mjerenje hemikalija. pH metar s osjetljivošću od ± 0.01 pH jedinica koristi se za preciznu kalibraciju medija. Kamera s makro-funkcijom ili mikroskop s povećanjem od 40 – 100 x omogućavaju dokumentaciju razvoja biljaka.

PRIPREMA HRANJIVOG MEDIJA

Priprema hranjivog medija započinje odmjeravanjem odgovarajuće količine Murashige i Skoog (MS) praha, pri čemu se koristi puna koncentracija (1×) za fazu multiplikacije, dok se za fazu ukorjenjivanja primjenjuje polovična koncentracija ($\frac{1}{2}\times$). MS prah se rastvara u približno 800 mL destilirane vode uz kontinuirano miješanje na magnetnoj mješalici, kako bi se dobila potpuno homogena otopina.

Nakon što se osnovni medij u potpunosti rastvori, dodaje se saharoza u koncentraciji 20–30 g/L, kao i regulatorni hormoni rasta prema potrebama određene faze mikropropagacije. Ukoliko je potrebno, u medij se dodaje aktivni ugljen u koncentraciji 1–2 g/L radi adsorpcije fenolnih spojeva koji mogu inhibirati razvoj biljnih tkiva. Slijedi dodavanje sredstva za očvršćivanje – agara (7–8 g/L) ili gelan-gume (2–3 g/L), uz temeljito miješanje do potpune disperzije.

pH vrijednost pripremljenog medija zatim se podešava na optimalnih 5,6–5,8 pomoću rastvora 1 M NaOH ili 1 M HCl. Nakon podešavanja pH vrijednosti, ukupni volumen se dopunjava do 1 L destiliranom vodom. Medij se potom raspoređuje u boce ili tikvice i zatvara aluminijskom folijom ili odgovarajućim poklopcima kako bi se spriječila kontaminacija.

Sterilizacija se provodi u autoklavu na 121 °C tokom 20 minuta. Nakon sterilizacije, boce se ostave da se ohlade do temperature pogod-ne za nalijevanje. Samo nalijevanje medija u sterilne posude izvedeno je u laminarnom kabinetu kako bi se održali strogi sterilni uvjeti. Ovim postupkom osigurava se optimalna sterilnost i funkcionalnost hranjivog medija za sve faze mikropropagacije krompira.

FAZE PROCESA

Pretretman - termoterapija i opciona hemoterapija

Pretretman obuhvata termoterapiju, a po potrebi i hemoterapiju, s ciljem smanjenja količine virusa u tkivu i ograničavanja kretanja virusa prema meristemskom tkivu. Time se povećava vjerovatnoća dobijanja bezvirusnih biljaka, što je posebno važno kod eradikacije najčešćih virusa krompira, uključujući PVY, PLRV, PVX i PVS.

Termoterapija se provodi na temperaturi od 34 do 38 °C tokom perioda od dvije do šest sedmica. Režim može biti kontinuiran ili s noćnim smanjenjem temperature na 28–30 °C. Biljkama se osigurava fotoperiod od 16 sati svjetla pri intenzitetu od 30–60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ovaj tretman dovodi do privremene inhibicije virusne replikacije, što olakšava uspješnu izolaciju meristema.

Hemoterapija se, ukoliko je predviđena validiranim laboratorijskim SOP-om (SOP 2/25) i mjerama biosigurnosti, može provoditi upotrebom ribavirina u koncentraciji od 20 do 40 mg/L u tečnim ili polutečnim medijima. Tretman se obično zadržava kroz jednu do dvije subkulture, nakon čega se biljke prenose na medij bez ribavirina radi potpunog uklanjanja ostataka supstance prije ekscizije meristema.

Sve parametre termoterapije i hemoterapije (temperaturu, trajanje tretmana i korištene koncentracije) potrebno je detaljno zabilježiti u laboratorijskom protokolu.

Sterilizacija klica i ekscizija meristema

Klice predviđene za izolaciju meristemske zone najprije se ispiraju pod mlazom vode u trajanju od 20–30 minuta, uz dodatak nekoliko kapi blagoga deterdženta kako bi se uklonile površinske nečistoće. Potom slijedi površinska sterilizacija: kratko uranjanje u 70 % etanol tokom 30–60 sekundi, nakon čega se uzorci tretiraju rastvorom natrijevog hipoklorita koncentracije 3–10 % tokom 10–15 minuta. U rastvor se dodaje jedna do dvije kapi Tween-20 radi boljeg kvašenja površine. Nakon tretmana, eksplantati se tri puta ispiraju sterilnom destiliranom vodom.

Ekscizija meristema se obavlja u sterilnim uvjetima laminarnog kabineta, uz korištenje stereomikroskopa. Apikalni meristem dužine 0,1–0,3 mm, zajedno s jednim do dva lisna primordija, pažljivo se izdvaja sterilnim mikroinstrumentima i prenosi na inicijacijski hranjivi medij. Inicijalni medij je ½ MS s 20–30 g/L saharoze, bez regulatora rasta ili s minimalnim dodatkom BAP-a (0,1–0,2 mg/L) u slučajevima kada je potrebno potaknuti oživljavanje meristemske zone.

Meristemi se inkubiraju 2–4 sedmice, a kao kriterij prelaska u narednu fazu uzima se pojava vidljivog rasta te formiranje mikroizdanaka dužine najmanje 3–5 mm, bez znakova kontaminacije.

Multiplikacija izdanaka

Nakon uspješne inicijacije, mikroizdanci se prenose na medij namijenjen multiplikaciji, koji se sastoji od punog MS-a (1×), saharoze u koncentraciji 20–30 g/L i regulatora rasta, BAP-a u koncentraciji od 0,5 do 2,0 mg/L. Po potrebi se može dodati i kinetin (0,5–1,0 mg/L), ovisno o sorti i reakciji tkiva. Medij se očvršćuje agarom ili gelan-gumom prema standardnim koncentracijama.

Biljčice se održavaju na temperaturi od 24–27 °C, uz fotoperiod od 16 sati svjetla i intenzitet od 50–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, te relativnu vlagu od 60–80 %. Subkulture se obavljaju svakih 4–6 sedmica. U kasnijim ciklusima multiplikacije preporučuje se smanjenje koncentracije BAP-a kako bi se izbjegao hiperhidricitet.

Svaki kontejner se mora jasno označiti šifrom serije, datumom, formulacijom medija i inicijalima operatera. Biljke prelaze u iduću fazu kada razviju vitalne izdanke dužine najmanje 2–3 cm, bez fizioloških deformacija i vidljivih znakova kontaminacije. U ovoj fazi provodi se i preliminarna virološka provjera serije.

Ukorjenjivanje

Proces ukorjenjivanja odvija se na mediju pripremljenom od polovične koncentracije MS-a ($\frac{1}{2}$ MS), uz dodatak saharoze u uobičajenoj koncentraciji od 20–30 g/L. Kao auksini koriste se IBA ili NAA u rasponu od 0,05 do 0,5 mg/L, dok se citokinini u ovoj fazi ne dodaju. Uslovi kultivacije identični su onima u fazi multiplikacije, iako je često dovoljan nešto niži intenzitet svjetla (50–80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

U roku od dvije do četiri sedmice formira se razvijen korijenski sistem. Biljke s hiperhidričnim ili morfološki nepravilnim tkivom se uklanjaju, dok se kod ostalih standardizira dužina izdanaka prije početka aklimatizacije. Kao kriterij za prelazak u narednu fazu uzimaju se dobro razvijeni izdanci dužine 3–5 cm i potpuno formiran korijenski sistem, uz potvrđeni virološki status serije.

Aklimatizacija (*ex vitro*)

Biljke spremne za aklimatizaciju pažljivo se uklanjaju iz hranjivog medija, a korijen se ispiru sterilnom destiliranom vodom kako bi se odstranio agar. Izdanci se kratko prosušuju na sterilnim papirnatim podlogama. Za sadnju se koristi sterilni supstrat pripremljen od treseta, perlita i kokosovih vlakana u omjeru 2:1:1, s pH vrijednošću između 5,5 i 6,0 i dobrom drenažom.

Biljke se sade plitko, bez zbijanja supstrata, a zatim se umjereno zalijevaju sterilnom vodom. U prvoj fazi aklimatizacije održava se temperatura od 22–26 °C i relativna vlaga od 70–90 %, koja se postiže pomoću prozirnih kupola, folija ili mini-tunela. Pokrovi se postepeno otvaraju tokom 7–10 dana radi prilagođavanja biljaka i smanjenja stresa pri prijelazu na standardne uvjete. Osvjetljenje se održava na nivou od 30–50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ difuznog svjetla uz redovnu ventilaciju kako bi se izbjeglo stvaranje kondenzata.

Biljke koje pokazuju simptome fiziološkog poremećaja ili infekcije uklanjaju se iz serije. Nakon završene aklimatizacije, zdravi izdanci mogu se prenijeti u hidroponski ili aeroponski sistem ili u inertni supstrat, gdje se odvija proizvodnja mini-gomolja u kontroliranim uslovima, što predstavlja osnovu za prebazi i bazni nivo proizvodnje elitnog sadnog materijala.

KONTROLA KVALITETE I VIROLOŠKI NADZOR

Virološki panel i učestalost testiranja

Kontrola zdravstvenog statusa biljaka tokom mikropropagacije predstavlja ključni dio procesa proizvodnje elitnog sadnog materijala krompira. U skladu s važećim standardima i preporukama, virološki nadzor obuhvata detekciju četiri ekonomski najznačajnija virusa krompira: PVY, PLRV, PVX i PVS. Ovi patogeni predstavljaju dominantnu prijetnju u vegetativnom razmnožavanju, te je njihova pravovremena identifikacija neophodna za osiguranje visokog kvaliteta finalnog sadnog materijala.

Prva linija testiranja provodi se metodom ELISA, koja omogućava efikasno i pouzdano skrining-testiranje velikog broja biljaka unutar svake serije i svake faze mikropropagacije. Pozitivni ili sumnjivi rezultati bivaju potvrđeni primjenom PCR ili RT-PCR metoda, koje osiguravaju visoku specifičnost i osjetljivost detekcije virusnih RNA ili DNA sekvenci.

Uzorkovanje se vrši na dvije ključne tačke procesa, i to nakon što se biljke stabilizuju u fazi multiplikacije, te ponovo neposredno prije aklimatizacije ex vitro. Dodatna testiranja mogu se provesti i u kasnijim fazama, ukoliko se tokom vizuelne inspekcije pojave simptomi koji bi mogli upućivati na moguću prisutnost virusa (SOP 2/25). Ovakav pristup osigurava stalni nadzor nad zdravstvenim statusom biljnog materijala i omogućava identifikaciju eventualnih reinfekcija ili neuspješnih eradikacija.

Kriteriji prihvatanja i otpisa

Biljke se smatraju prihvatljivim za daljnji proces samo ukoliko su serološki i molekularno negativne na sve viruse iz standardnog panela (PVY, PLRV, PVX i PVS). Pored virološke ispravnosti, biljni materijal mora biti morfološki uniforman, bez znakova fiziološkog stresa, deformacija ili nepravilnosti u rastu. Samo takve biljke mogu biti uključene u iduću fazu proizvodnog procesa i kasnije koristiti kao izvor elitnog sadnog materijala.

Biljke koje pokažu pozitivne rezultate na bilo koji od navedenih virusa automatski se otpisuju iz serije. Isti postupak se primjenjuje na materijal s jasnim sumnjama na virološku infekciju, uključujući pojavu mozaika, hloroza, uvrtnja listova ili nekarakterističnih promjena u rastu. Također, biljke s trajnim hiperhidricitetom, deformacijama, kao i one kod kojih se redovno pojavljuju kontaminacije bakterijama ili gljivama, eliminišu se iz proizvodnog ciklusa.

U slučajevima u kojima je omogućeno internim SOP-om i sistemom kontrole kvaliteta, određene serije mogu biti vraćene u karantinski tretman termoterapijom ili hemoterapijom. Ovakav pristup dozvoljen je isključivo uz prethodno odobrenje nadležnih osoba za kvalitet i uz strogo poštivanje biosigurnosnih mjera.

Sterilnost i kontrola kontaminacija

Održavanje sterilnih uvjeta tokom procesa mikropropagacije od presudne je važnosti za kvalitet i sigurnost proizvodnog ciklusa. Vizuelna inspekcija kultura obavlja se najmanje jednom sedmično, pri čemu se bilježe eventualni znaci bakterijskih, gljivičnih ili algalnih kontaminacija. Sve posude s vidljivom kontaminacijom odmah se izoliraju, tretiraju kao biološki otpad i uklanjaju prema internim pravilima biosigurnosti.

Radne površine laminarnog kabineta i pripadajuća oprema redovno se dekontaminiraju 70 % etanolom, dok se UV lampa koristi za dodatnu sterilizaciju prostora prije i poslije rada. U posebnim situacijama, kada se kontaminacije pojavljuju učestalo ili imaju tendenciju širenja, može se privremeno primijeniti laboratorijski odobreni antimikrobni dodatak u hranjivi medij, isključivo u skladu sa preporukama stručnog osoblja.

DOKUMENTACIJA I SLJEDIVOST

Uspostavljanje potpune sljedivosti predstavlja osnovni uslov za kontrolu kvaliteta u procesu mikropropagacije i proizvodnje elitnog sadnog materijala. Za svaku seriju vodi se serijski list koji sadrži jedinstvenu šifru serije, oznaku genotipa, datum uspostavljanja kulture, ime operatera, tačnu formulaciju korištenog medija, ukupan broj posuda i biljaka u seriji, kao i zabilježene gubitke tokom svake faze procesa. Ovakva dokumentacija omogućava praćenje razvoja biljnog materijala, identifikaciju odstupanja i pravovremenu intervenciju.

Pored osnovne dokumentacije, obavezno se vode i zapisi o sterilizaciji, uključujući identifikacijski broj autoklava, tip ciklusa, postignutu temperaturu i vrijeme sterilizacije. Ovi podaci služe kao dokaz da je sterilizacijski proces proveden u skladu sa standardima i da korišteni materijali i mediji zadovoljavaju sve higijenske zahtjeve.

Zapisi o kontroli kvaliteta obuhvataju rezultate provedenih ELISA i PCR testova za svaki set uzoraka, zajedno s bilješkama o donesenim odlukama, uključujući prihvatanje ili otpis pojedinačnih biljaka ili kompletnih serija. Svaka promjena u postupcima, medijima ili načinu rada mora biti dokumentovana kroz sistem verzioniranja protokola, uz jasno naznačen datum izmjene i potpis odgovorne osobe. Time se osigurava transparentnost, odgovornost i dosljedna primjena standardiziranih metoda.

SIGURNOST I BIOSIGURNOST

Rad u laboratoriju za mikropropagaciju podrazumijeva strogo pridržavanje biosigurnosnih pravila kako bi se zaštitilo osoblje, spriječila kontaminacija materijala i osigurao integritet procesa. Sve manipulacije biljnim tkivima, hranjivim medijima i sterilnim instrumentima obavljaju se isključivo u laminarnom kabinetu klase II. Osoblje je dužno nositi odgovarajuću zaštitnu opremu, uključujući sterilne rukavice, laboratorijski mantil i zaštitnu masku, te pravilno odlagati sav biološki i hemijski otpad u skladu sa biosigurnosnim propisima.

Primjena hemoterapeutika, kao što je ribavirin, dozvoljena je samo uz prethodno odobrenje nadležnog osoblja, striktno pridržavanje validiranih koncentracija i vođenje evidencije o korištenim količinama i serijama biljaka na koje su tretmani primijenjeni. Ovakve supstance zahtijevaju poseban oprez, jasno označavanje i kontrolisano rukovanje.

Rad sa biljnim patogenima i laboratorijskim hemikalijama mora biti usklađen sa svim relevantnim lokalnim i nacionalnim propisima, uključujući zakone o zaštiti na radu, laboratorijskoj sigurnosti i biosigurnosnim standardima u biotehničkim laboratorijima. Poštivanje ovih procedura ključno je za osiguranje sigurnog i odgovornog rada u svim fazama mikropropagacije.

KRITERIJI USPJEHA I TIPIČNI ISHODI

Uspješnost procesa mikropropagacije procjenjuje se na osnovu jasno definisanih kvantitativnih i kvalitativnih kriterija. U fazi inicijacije meristema, tipičan uspjeh podrazumijeva postizanje 60–90 % čistih kultura, pri čemu se procenat može razlikovati u zavisnosti od sorte, zdravstvenog stanja klica i kvaliteta predtretmana.

Tokom faze multiplikacije, očekivani faktor umnožavanja izdanaka kreće se od 3× do 6× po jednoj subkulturi, pod uslovom da se biljke razvijaju bez značajne pojave hiperhidriciteta ili drugih fizioloških poremećaja. Optimalna reakcija biljaka u ovoj fazi direktno utiče na ukupnu efikasnost procesa i broj generisanih izdanaka dostupnih za ukorjenjivanje.

U fazi ukorjenjivanja, više od 80 % biljaka treba razviti funkcionalan korijenov sistem u periodu od dvije do četiri sedmice, što je indikator pravilno optimiziranog medija i stabilnih uslova kultivacije. Konačno, u fazi aklimatizacije, očekivani procenat preživljavanja kreće se iznad 75 % nakon četiri do šest sedmica pod kontrolisanim uvjetima temperature, vlage i osvjetljenja. Ovakvi rezultati ukazuju na uspješno savladavanje stresa prelaska iz *in vitro* u *ex vitro* uvjete i potvrđuju kvalitet prethodnih faza procesa.

HISTORIJA REVIZIJE DOKUMENTA

SOP br.	AUTOR/I	DATUM KREIRANJA
1/25	Jasmin Grahić, Mirha Đikić, Drena Gadžo, Arnela Okić, Merim Halilović, Ajdin Avdović	01. 09. 2025. godine

NAZIV PROCEDURE
KULTURA TKIVA ZA PROIZVODNJU ELITNOG SADNOG MATERIJALA KROMPIRA

Verzija	Datum odobrenja	Autor/i	Opis revizije
1.0		Jasmin Grahić, Mirha Đikić, Drena Gadžo, Arnela Okić, Merim Halilović, Ajdin Avdović	Novi dokument

LAB-SPECIFIČNA REVIZIJA

Verzija	Datum odobrenja	Autor	Opis revizije