

Organogeneza eksplantata borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u kulturi tkiva in vitro

Rajndl, Patrik

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:633409>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-21**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Patrik Rajndl

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Organogeneza eksplantata borovnice
(*Vaccinium corymbosum* L.) u kulturi tkiva *in vitro*

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Patrik Rajndl

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Organogeneza eksplantata borovnice
(*Vaccinium corymbosum* L.) u kulturi tkiva *in vitro*

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. mag.ing.agr. Dejan Bošnjak, mentor
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, član
3. dr.sc. Monika Tkalec Kojić, član

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij, smjer Hortikultura

Završni rad

Organogeneza eksplantata borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u kulturi tkiva *in vitro*

Patrik Rajndl

Sažetak: Proizvodnja borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u RH je zanemariva iz razloga što je relativno nova intenzivna kultura kojoj nedostaje dovoljno iskustva od strane domaćih proizvođača. Mikropropagacija, odnosno tehnika kulture tkiva *in vitro* osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog sadnog materijala u kratkom vremenskom intervalu, a proizvodnja se odvija u kontroliranim i aseptičnim uvjetima. Pokus je postavljen u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek tijekom 2020. godine. Cilj ovog završnog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnosti organogeneze eksplantata borovnice u kulturi tkiva *in vitro*. Tretmani su uključivali dva tipa eksplantata: bazni i vršni dio izdanaka. Ispitivan je i utjecaj broja eksplantata po teglici (25 i 50) na organogenezu i multiplikaciju budućih mikroizdanaka. Rezultati ukazuju kako veći broj eksplantata unutar *in vitro* posude nema štetan utjecaj na daljnju fazu multiplikacije (multiplikacija je povećana). Vršni tip eksplantata rezultirao je većim brojem izdanaka i listova, dok je visina izdanaka i multiplikacija bila veća na baznom tipu eksplantata. Prema dobivenim rezultatima zaključujemo kako nema velike razlike u organogenezi između pojedinih tipova eksplantata borovnice (vršni ili bazni dio). Nastale mikroizdanke s oba tipa eksplantata moguće je uključiti u daljnju fazu multiplikacije i/ili rizogeneze.

Ključne riječi: borovnica, duke, mikropropagacija, organogeneza

23 stranica, 2 tablica, 17 grafikona i slika, 7 literaturni navod
Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Horticulture

BSc Thesis

Organogenesis of blueberry explants (*Vaccinium corymbosum* L.) in tissue culture

Patrik Rajndl

Summary: The production of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) in Croatia is negligible due to the fact that it is a relatively new intensive fruit crop with lack experience of domestic producers. Micropropagation ensures the production of high quality and phytosanitary safe planting material in a short time interval with production in controlled and aseptic conditions. The whole experiment was carried out on *in vitro* laboratory for fruit growing, Faculty of Agrobiotechnical Science Osijek due to the 2020 year. The aim of this BSc Thesis is to examine the possibility of organogenesis blueberries explants in tissue culture *in vitro*. Treatments included two types of explants: the base and the apical part of the shoot. The influence of the number of explants per *in vitro* jar (25 and 50) on organogenesis and multiplication rate of future microshoots was also investigated. The results indicate that a greater number of explants inside the *in vitro* jar (50) has no harmful influence in the further phase of multiplication (multiplication is increased). Apical type of explant resulted in more shoots and leaves, while shoot height and multiplication rate was greater on the base type of explants. According to the obtained results, we conclude that there is no greater difference on the organogenesis between explants types. New microshoots from both type of explants can be included in the further phase of multiplication and/or rhizogenesis.

Keywords: blueberry, duke, micropropagation, organogenesis

23 pages, 2 tables, 17 figures, 7 references
BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Razmnožavanje borovnice.....	2
1.2. Sadni materijal borovnice.....	5
1.3. Mikropropagacija – kultura tkiva <i>in vitro</i>	6
<i>1.3.1. Prednosti i nedostaci mikropropagacije</i>	7
<i>1.3.2. Utjecaj razvojnog stadija biljke</i>	10
<i>1.3.3. Opći plan mikropropagacije in vitro</i>	11
2. MATERIJAL I METODE	13
2.1. Opis laboratorija i cilj istraživanja.....	13
2.2. Kultivar, postavljanje pokusa i tretmani u istraživanju.....	14
2.3. Mjerenja u istraživanju.....	16
3. REZULTATI I RASPRAVA	17
3.1. Utjecaj broja eksplantata na organogenezu borovnice.....	17
3.2. Utjecaj tipa eksplantata na organogenezu borovnice.....	18
3.3. Rezultati na razini cijelog istraživanja.....	20
4. ZAKLJUČAK	21
5. POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Proizvodnja borovnice (*Vaccinium corymbosum L.*) u RH je zanemariva iz razloga što je relativno nova intenzivna kultura kojoj nedostaje dovoljno iskustva od strane domaćih proizvođača. Posljednjih godina uslijed politike mjera ruralnog razvoja od strane EU i RH putem europskih fondova, dolazi do interesa od strane proizvođača za ovom kulturom.

Zabilježen je i nagli skok u potrebama rasadničara za kvalitetnim zdravim i certificiranim sadnim materijalom ove voćne vrste. Nije poznato koliko se u RH proizvede sadnog materijala tehnikom *in vitro*, a zastupljenost akreditiranih laboratorija za proizvodnju sadnog materijala u našoj zemlji vrlo je mala. Većina sadnog materijala borovnice na našem tržištu potječe iz drugih država članica EU.

Mikropropagacija, odnosno tehnika kulture tkiva *in vitro* osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog sadnog materijala u kratkom vremenskom intervalu, a proizvodnja se odvija u kontroliranim i aseptičnim uvjetima. Glavne prednosti mikropropagacije su u malim količina početnog inicijalnog biljnog materijala zbog čega se ne moraju formirati veliki matičnjaci, a koeficijent umnožavanja je visok. Ne postoji ovisnost o sezonskoj dinamici te je značajna ušteda u prostoru i vremenu.

Pokus je postavljen u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek tijekom 2020. godine.

Cilj ovog završnog rada usmjeren je na ispitivanje organogeneze eksplantata borovnice u kulturi tkiva *in vitro*. Tretmani su uključivali dva tipa eksplantata: bazni i vršni dio izdanka. Ispitivan je i utjecaj gustoće, odnosno broja eksplantata po teglici (25 i 50) na organogenezu i multiplikaciju budućih mikroizdanaka *in vitro*.

1.1. Razmnožavanje borovnice

Vaccinium vrste je moguće razmnožavati preko sjemena ali i vegetativnim metodama. Sjemenjaci u uzgoju ne igraju nikakvu ulogu zato što se na takav način gubi sortni karakter i biljke dolaze u rod sa nekoliko godina zakašnjenja. Nekakvo značenje imaju pri stvaranju novih sorta.

Vrlo sitne sjemenke (Slika 1.) plodova borovnice (1g sjemena = 4000 sjemenki) su u vremenu zriobe već sposobne za klijanje i nije im potrebna stratifikacija (dugovremeno djelovanje hladne faze). Sjemenke možemo sijati odmah nakon berbe ili sljedeće godine u proljeće, jer sjemenke zadržavaju klijavost više godina. Zbog sitne veličine, sjemenke prije sijanja obično miješamo s pijeskom. Supstrat bi trebao biti prozračan, sa sitnim porama i kisele reakcije, dobra iskustva postoje sa mješavinom treseta i pijeska (Ebert, 2008.).

Sjeme borovnice ima postotak klijanja između 50 i 80%. Korijen sa pojavljuje nakon 14-35 dana listići 3-8 tjedana, a do pojave pravog lišća 6-10 tjedana. Mlade sjemenke se preko zime čuva zaštićene od mraza i prema vremenu sadnje se u proljeće presađuju u prirodu ili u kontejnere. Nakon pojave 10-15 listova počinje stvaranje bočnih izbojaka koje prerastaju glavni izbojak i na taj način dobivamo ranu razgranatost biljke.



Slika 1. Sjemenke borovnice, (Izvor: <https://www.amazon.com/>)

Kao materijal za sadnju u obzir dolaze samo vegetativno razmnoženi grmovi. Borovnice se razmnožavaju različitim vrstama reznica iako je moguća primjena svih ostalih metoda razmnažanja, uključujući i cijepljenje.

Zelene ali i zrele reznice (Slika 2.) se uzimaju od izabranih i zdravih matičnih grmova i u posebnim prostorima za razmnažanje im se omogućuje ukorjenjivanje, tj. rizogeneza. Zrele reznice bi trebalo uzimati sa izbojaka promjera 4-6 mm sa što manjim brojem pupova. U anglosaksonskom području takvi 50-75 cm dugi izbojci označavaju se kao „bičevi“. Takve bičeve je u rodnim nasadima malo teže pronaći stoga što dugi vegetativni izbojci ne odgovaraju cilju proizvodnje što većeg broja plodova. Za razmnažanje je potrebno odabrati matičnu biljku, jako je podrezati i opskrbiti dušikom kako bi stvorila dovoljno duge i jake izbojke (Ebert, 2008.).

Zrele reznice je najbolje rezati u proljeće sve do pojave bubrenja pupova. Tada ih možemo odmah pripremiti za ukorjenjivanje ili pohraniti na hladnom mjestu. Ako reznice režemo u jesen prije samog opadanja lišća, potrebno je hladnim skladištenjem (2-4°C) osigurati potrebnu količinu hladnoće kako bismo osigurali sigurno pupanje.

Zrele reznice trebaju sadržavati barem 5 pupova, pri čemu iz supstrata trebaju viriti samo gornji ili gornja 2 pupa. Rez treba napraviti tako da donji rez napravimo direktno ispod donjeg pupa dok gornji rez treba napraviti 1 cm iznad gornjeg pupa. Reznice koje smo odrezali bliže bazi izbojka generalno se bolje ukorjenjuju od reznica s gornjeg dijela izbojka. Hormoni za ukorjenjivanje koje nalazimo u preparatima na tržištu, mogu znatno poboljšati stvaranje korijena. Nakon ukorjenjivanja reznice početkom jeseni presađujemo u prirodu ili kontejnere.



Slika 2. Razmnožavanje reznicama, (Izvor: <https://www.seedparade.co.uk>)

Supstrat za ukorjenjivanje bi trebao imati iste karakteristike kao za sjetvu: kiselu reakciju, visoki udio organskih tvari, prozračnost ali i dovoljnu sposobnost zadržavanja vode. Takva

svojstva dobivamo miješanjem raznih materijala poput treseta, lišća ili piljevine sa pijeskom ili verimikulitom. Reznice se pikiraju vrlo gusto, otprilike u razmaku 5 x 5 cm.

Do razvoja korijena, ovisno o sorti potrebno je 8-15 tjedana (Slika 3.). Ako postoji mogućnost zagrijavanja supstrata, taj period se bitno skraćuje. Prije nego dođe do ukorjenjivanja, dolazi do pupanja lisnih pupova. Budući da tijekom tog razdoblja nije omogućena opskrba vodom preko korijena, lišće je potrebno izložiti stalnoj vlazi. Za tu svrhu najpogodniji je uređaj za stvaranje magle koji je potreban i za stvaranje zelenih reznica. Pod zelenim reznicama smatramo 10 cm duge vrhove izbojaka ili listove odrezane s odabranih biljaka nakon završetka prve faze izbojaka. Njih je potrebno odmah postaviti u medij za ukorjenjivanje (Ebert, 2008.).



Slika 3. Ukorjenjene reznice borovnice: a. zeljasta reznica i b. odrvnjela reznica,
(Izvor: <https://sites.google.com>)

U tvrtkama koje se bave presadnicama borovnica, reznice se pikiraju u kontejnere sa tresetnim supstratom nakon čega ga se postavlja u tunele od folije ili male staklenike. Preko uređaja za stvaranje magle osigurava se dovoljna vlažnost zraka. Temperature od 25-30°C i visoka vlažnost zraka omogućuju stvaranje korijena unutar nekoliko tjedana. Ukorjenjivanje je moguće još poboljšati umakanjem u otopinu auksina. Reznice se bolje ukorjenjuju ukoliko ih uzimamo sa mlađih grmova. Neki od pokusa su pokazali da se reznice inficirane gljivama mikorize bolje razvijaju od neinficiranih reznica.

1.2. Sadni materijal borovnice

Izboru sadnog materijala treba posvetiti posebnu pažnju jer su izbor sorte i kvaliteta materijala odlučujući za dobar urod i dobro zdravstveno stanje nasada. Potrebno je napomenuti da nasad borovnice ima vijek trajanja do 50 godina.

Za sadnju možemo koristiti kontejnerske sadnice ili balirane sadnice, pri čemu treba obratiti pozornost da grmovi budu stari 2-3 godine (Slika 4.). Sadnice većinom kupujemo u veličinama 20/30 cm, 30/40 cm, 40/60 cm. Kontejnerske sadnice možemo saditi i ako imaju lišće, dok balirane sadnice treba saditi samo u stadiju mirovanja. Sadnice iz kontejnera imaju prednost jer ih je moguće saditi u rujnu jer se prije zime uspijevaju ukorijeniti. Balirane sadnice su u pravilu bolje razvijene nego one iz kontejnera ali sadrže manje sitnog korijenja koje se u velikoj mjeri oštećuje vađenjem. Sadnju takvih sadnica treba započeti najranije od sredine listopada nakon završetka rasta. Ovisno o vremenskim uvjetima, ako ne postoji opasnost od mraza, sadnju možemo obaviti i u proljeće od sredine ožujka do sredine travnja. Prednost bi ipak trebalo dati sadnji u jesen kako bi se korijen bolje razvio i omogućio dobru opskrbu vodom u proljeće. Mogućnost navodnjavanja za prevladavanje sušnog perioda ima velike prednosti (Ebert, 2008.).

Površine predviđene za sadnju borovnica moraju biti pravovremeno očišćene. Ako koristimo šumsku površinu, potrebno je ukloniti sve ostatke korijenja i grana godinu dana prije sadnje kako bi se tlo dovoljno sleglo. Mnoge vrste gljiva koje uzrokuju trulež korijena se nalaze na korijenju stabala i kupina pa je to korijenje potrebno u potpunosti ukloniti s površine. Gotovo u pravilu je potrebno izvršiti gnojidbu (nakon analize tla) i dovesti veću količinu organskog materijala, osobito ako je površina bila korištena kao oranica. Ako je reakcija tla blizu neutralne, potrebno je u tlo umiješati određenu količinu sumpornog praha, npr. 50 kg praha po ha osigurava, ovisno o vrsti tla, snižavanje pH za jedan stupanj. Na nekadašnjim oraničnim površinama potrebno je provesti izmjenu tla. Provodimo ju na više načina. Supstrat možemo ili unijeti u tlo (u jarke ili jame za sadnju) ili iskrcati na površinu u obliku nasipa. Koristimo U uzgoj u jarcima na razmaku budućih redova (npr. 3m) kopamo 0,5 do 1 m širok i 0,3-0,5 m dubok jarak. U tu svrhu možemo koristiti plug. Nakon toga rovove punimo supstratom (Ebert, 2008.).



Slika 4. Kontejnirane sadnice borovnice, (Izvor: <https://www.fallcreeknursery.com>)

1.3. Mikropropagacija – kultura tkiva *in vitro*

Biljke se razmnožavaju na dva načina: generativno (spolno) s pomoću sjemenki i vegetativno (nespolno) s pomoću vegetativnih dijelova biljke (reznica, lukovica, gomolja). Vegetativno razmnožavanje nazivamo još klonsko razmnožavanje. U određenim uvjetima oba načina mogu biti otežana. Kada spolno razmnožavanje nije moguće (sjeme se ne stvara ili se stvara u premaloj količini ili pak prebrzo gubi vijabilnost), može se primijeniti vegetativno razmnožavanje.

Vegetativno razmnožavanje *in vivo* (reznicama, vriježama, odvajanjem komadića biljke, povaljenicama, lukovicama) primjenjuje se u poljoprivredi već vrlo dugo i ima podjednako važnu ulogu kao i razmnožavanje sjemenkama; mnoge važne kulture kao krumpir, jagode, vinova loza, mnoge lukovičaste kulture, drvenaste voćke, cvjetne kulture i ostale razmnožavaju se isključivo vegetativno.

Osim za reprodukciju, vegetativno je razmnožavanje važno i u oplemenjivanju: stabilne su roditeljske linije potrebne (što se postiže vegetativnim razmnožavanjem) za trajnu proizvodnju sjemena. Kloniranje je važno i ako se želi osnovati banka gena. Za dobivanje solidnih mutanata nakon izvedene mutacije potrebno je stvaranje adventivnih izdanaka.

Klasične metode vegetativnog razmnožavanja, međutim, nisu široko primjenjive, a često ih nije moguće ostvariti zbog brojnih poteškoća i nedostataka, kao što su sporost i teškoće u provedbi, previsoka cijena provedbe ili nemogućnost vegetativnog razmnožavanja biljaka.

Posljednjih desetak godina, nakon što se pokazalo, da se znatno veći broj biljnih vrsta može klonirati *in vitro* nego *in vivo*, znanje koje se steklo istraživanjem razmnožavanja *in vitro* brzo se nagomilalo: podjednako za biljke umjerenih područja, suptropskih i tropskih, zeljastih vrsta i drvenastih trajnica. Danas je u uvjetima *in vitro* moguće klonirati i one vrste koje do sada klasičnim metodama nikako nije bilo moguće (Sibila, 1994.).

Od postojećih tehnika kulture biljnog tkiva i stanica, kloniranje biljaka postiglo je do danas najširu primjenu.

1.3.1. Prednosti i nedostaci mikropropagacije

Danas se mikropropagaciji mnogih biljnih vrsta daje prednost u odnosu na klasično vegetativno razmnožavanje, i to zbog ovih činjenica:

- a) Razmnožavanje *in vitro* mnogo je brže od razmnožavanja *in vivo*
- b) Moguće je razmnožavati i one biljke koje u uvjetima *in vivo* nije moguće (rejuvenilizacijom koja se može ponoviti *in vitro*).
- c) Mikrokloniranje biljke često rastu bolje i snažnije od biljaka kloniranih *in vivo*, to može biti uvjetovano rejuvenilizacijom i/ili činjenicom da su one zdrave i oslobođene patogenih klica. Povećani vigor i produktivnost mikrorazmnožavanja jagoda pripisali su neki istraživači njihovoj boljoj prilagođenosti za izmjenu plinova.
- d) U kulturi *in vitro* razmnožavaju se samo zdrave biljke, bilo da je to združeno sa strogom selekcijom početnog materijala bilo pak da biljke ozdravljaju primjenom kulture *in vitro*. Tehnologija *in vitro* također omogućava prijenos biljaka na veće (međunarodne) udaljenosti.
- e) Budući da je za postavljanje kulture *in vitro* obično potrebno vrlo malo početnog materijala, vegetativno razmnožavanje može započeti s vrlo odabranim i posebnim

materijalom. Zahvaljujući tome može se brzo postaviti poljski pokus potreban za daljnja selekcijska ispitivanja.

f) Razmnožavanje *in vitro* može uštedjeti znatna sredstva koja se inače troše za grijanje staklenika i prostora. Prostor potreban za podizanje i razmnožavanje matičnih biljaka znatno se smanjuje upotrebom kulture *in vitro*

g) Zahvaljujući optimalnim uvjetima (hranidbena podloga i fizički faktori) omogućeno je precizno vremensko planiranje proizvodnje presadnica, čime se poništava sezonski utjecaj i postiže proizvodnju za cijelu godinu.

h) Razmnožavanje *in vitro* omogućava ukorjenjivanje reznica pa je cijepljenje pupova na podloge nepotrebno (time se štedi vrijeme i izbjegavaju problemi inkompatibilnosti). To je posebno važno za vrste kao što su rododendron, ruže ili jorgovani.

i) Za profesionalne proizvođače kultura *in vitro* ima još dodatne prednosti:

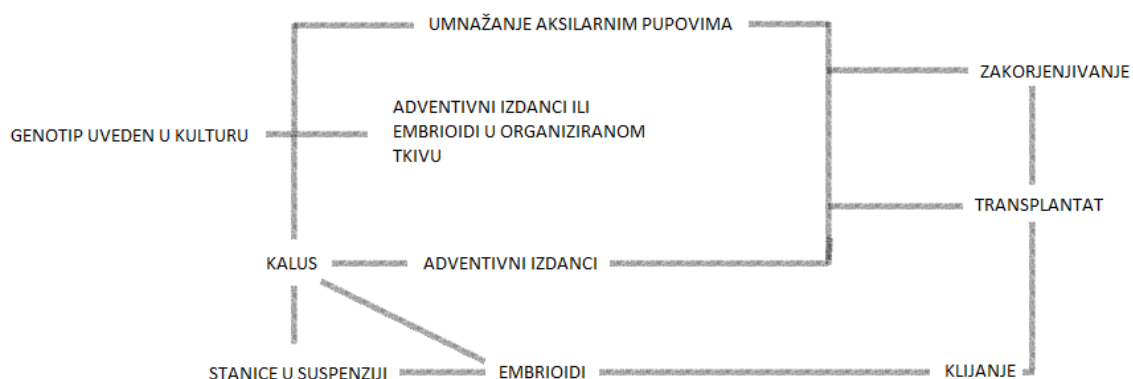
- nove sorte mogu se komercijalno brzo razmnožavati i tako ponuditi tržištu u mnogo kraćem vremenu.
- mogu se brže postaviti mali roditeljski klonovi za stvaranje F 1 - hibrida
- oplemenjivači mogu brže postići solidne mutante poticanjem adventivnih pupova i izdanaka
- kultura *in vitro* posebno je korisna za osnivanje banke gena koja čuva zdrav, od virusa slobodni biljni materijal, na niskoj temperaturi i malom prostoru.
- neke biljke potrebno je ustaliti i razmnožavati vegetativno jer su spolno sterilne (haploidi, sterilne mutante, linije koje nose citoplazmatsku mušku sterilnost), a potrebne su u stvaranju križanaca, također i rijetki aneuploidi ili biljke s neobičnim kromosomskim kombinacijama koje bi se mogle izgubiti ako se razmnože sjemenom, kao i posebne heterozigotne genske kombinacije (Dale i Webb, 1985.)

Nedostaci što ih može imati ova tehnologija:

- a) Genetička stabilnost u nekim je sustavima razmnožavanja *in vitro* vrlo niska (umnožavanje adventivnim izdancima i somatskim embrijima u kalusnim kulturama).
- b) Biljke iz kulture mogu, nakon prijenosa u uvjete *in vivo*, pokazivati određene loše značajke kao npr. grmoliki rast (nastavlja se stvaranje postraničnih ogranaka) ili potpuni povrat na juvenilne karakteristike.
- c) kod drvenastih vrsta često je vrlo teško potaknuti ukorjenjivanje reznica *in vitro* (isto kao i s klasičnim reznicama). Kod nekih biljaka korijenje zametnuto *in vitro* nije funkcioniralo u uvjetima *in vivo* i mora biti zamijenjeno novim korijenjem koje je prilagođeno supstratu.
- d) Prijenos biljaka iz uvjeta *in vitro* u uvjete *in vivo* kod nekih je vrsta posebno zahtjevan i težak.
- e) Mikroklonirani genotip biljaka, koji će na kraju uzgajati na otvorenome u polju, može biti osjetljiv na bolesti i uništen od patogenog organizma koji ga je napao. Kod tropskog drveća kao što su uljne palme plantažira se izmiješano više klonova, kako bi se izbjegao ovaj problem. Za zaštitu biljaka proizvedenih *in vitro* mogu se primijeniti intenzivne zaštite mjere.
- f) Regenerativna sposobnost može se izgubiti nakon određenog broja supkultura kalusnog tkiva ili stanica.
- g) U nekim slučajevima sterilna je izolacija eksplantata neobično teška.
- h) Jedna od značajki kloniranja *in vitro* opsežan je rad koji uvjetuje relativno visoku cijenu nastalih biljaka *in vitro* (Smith, 1986). Upotreba specijalnih tehnika (uzgoj u fermentorima ili upotreba robota) koje bi smanjile cijenu troškova, još su u fazi ispitivanja.

Presadnice (propagule) u uvjetima *in vitro* mogu se stvarati na tri načina: poticanjem rasta aksilarnih pupova, stvaranjem adventivnih izdanaka i somatskom embriogenezom. Svaka od ovih triju metoda ima svoje prednosti i nedostatke (Sibila, 1994.).

Metode za kloniranje biljaka *in vitro* jesu: pojedinačni nodijalni segmenti (reznice), aksilarno grananje, regeneracija adventivnih organa (korijena i izdanaka) na eksplantatima (Slika 5.).



Slika 5. Metode razmnožavanja i regeneracije biljaka u klonskom razmnožavanju *in vitro* (Izvor: Sibila, 1994.)

Nakon što smo naveli nedostatke i prednosti vegetativnog razmnožavanja *in vitro* možemo još istaknuti kriterije koji su poželjni i koji omogućavaju sigurno klonsko razmnožavanje. To su genetska stabilnost, stroga selekcija zdravog početnog materijala, relativna lakoća prijenosa biljaka iz uvjeta *in vitro* (epruvete) u vanjske uvjete, trajni regeneracijski potencijal, te na kraju postupak razmnožavanja ne smije biti previše kompliciran, a biljke koje su proizvedene moraju se ekonomski isplatiti (Sibila, 1994.).

1.3.2. Utjecaj razvojnog stadija biljke

Uspješnost razmnožavanja izrazito ovisi o razvojnome stadiju biljke od koje se uzima početni materijal za postavljanje kulture *in vitro*. Mlade biljke imaju veći regeneracijski potencijal od odraslih biljaka. Često tek odrasla biljka pokazuje svojstva zbog kojih je želimo vegetativno razmnožiti, što napose vrijedi za drvenaste vrste. U tom slučaju matičnu biljku moramo pokušati prije toga pomladiti (rejuvenilizirati).

Pomlađivanje se katkada može postići kulturom meristema, metodom reznica ili vegetativnog vrška na mladu podlogu, upotrebom onih dijelova biljke koji su zadržali svojstva, te čestim kljaštrenjem kako bi se potaknulo stvaranje bočnih izdanaka. Stvaranje izdanaka i somatskih embrija može također uzrokovati pomlađivanje, no budući da se u

ovim postupcima često usporedno pojavljuju i genetske modifikacije (mutacije), valja biti oprezan ako je svrha dobivanje materijala istovjetna izvornom (Sibila, 1994.).

Moramo istaknuti da postoji velika razlika u mogućnosti razmnožavanja *in vitro* između zeljastih i drvenastih vrsta. Drvenaste vrste općenito su mnogo zahtjevnije i teže se kultiviraju *in vitro* zbog ovih razloga:

1. Drvenaste vrste imaju relativno slabiju regeneracijsku mogućnost u usporedbi sa zeljastim biljkama.
2. Istraživanja na drveću i grmlju započela su relativno kasno.
3. Rejuvenilizacija je kod drveća općenito vrlo teška.
4. Stopa umnožavanja mnogo je niža kod drvenastih vrsta
5. Dormanca ima važnu ulogu kod drveća i grmlja.
6. Topofizis ima važnu ulogu kod drveća.
7. Drvenaste su vrste podložnije izlučivanju toksičnih tvari u hranidbenu podlogu.
8. Sterilizacija putnog materijala često je vrlo teška, posebno ako biljka raste u polju.
9. Tražene značajke drveća i grmlja najčešće se mogu utvrditi tek kada su biljke dosegle odraslu fazu.
10. Genetička varijabilnost drveća je općenito veća nego u poljoprivrednih i cvjetnih kultura

1.3.3. Opći plan mikropropagacije in vitro

Postupak vegetativnog razmnožavanja može se raščlaniti na više faza (Murashige, 1974.; Debergh i Maene, 1981.) ili drugim riječima, da se sastoji od nekoliko međusobno različitih postupaka.

Opći plan mikropropagacije obuhvaća nekoliko ključnih faza (Slika 6.):

Faza 0: postupci prije kulture

- Ova faza uključuje sve postupke prije početka kulture *in vitro*: pravilan postupak sa materijalom, njegovo čuvanje u zdravu stanju (staklenik i posude čiste, bez kukaca, zalijevane samo vodom, čuvanje biljaka u relativno suhim uvjetima).

Faza 1: uvođenje u kulturu

- Ova faza pokriva sterilnu izolaciju meristema, vegetacijskog vrška, eksplantata i dr. Ako postoji unutrašnja infekcija, potrebno je primijeniti posebne tehnike

Faza 2: umnožavanje ili reprodukcija

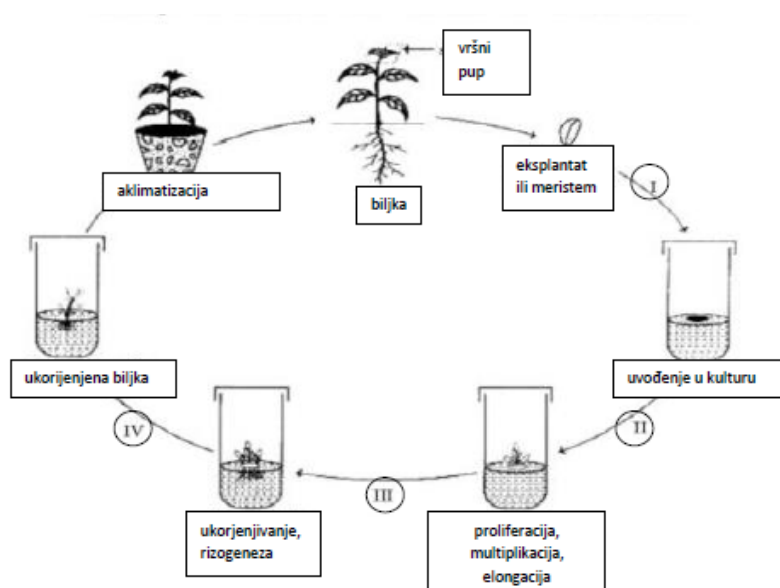
- Faza razmnožavanja (multiplikacije). Glavna svrha ove faze je postići razmnožavanje bez gubitka genetičke stabilnosti

Faza 3: priprema kultura za prijenos biljčica u tlo

- Ona uključuje pripremu izdanaka ili biljaka dobivenih u II. fazi za prijenos u tlo. To može uključivati: početak izduživanja izdanaka, zaustavljanje stvaranja korijena, bilo *in vitro* bilo *in vivo*.

Faza 4: prijenos biljčica u tlo

- U ovoj fazi biljke se prenose iz epruvete u tlo i prilagođavaju se na rast u vanjskim uvjetima (Sibila, 1994.).



Slika 6. Faze mikropropagacije, (Izvor: <https://www.pinterest.com>)

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Opis laboratorija i cilj istraživanja

Pokus je obavljen u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS) u sklopu kojeg se vrše mnoga *in vitro* istraživanja na raznim voćnim vrstama (višnja, borovnica, malina, orah, borovnica, paulovnja, lijeska, vegetativne podloge za trešnju, goji, poncirus, itd.). Katedra se bavi znanstveno istraživačkim radom, edukacijom studenata, proizvodnjom sadnog materijala i sekundarnih metabolita. Laboratorij posjeduje svu opremu potrebnu za uspješno provođenje mikropropagacije (laminarni stol/kabinet, autoklav, miješalica, pH metar, sterilizator, pincete, skalpeli, teglice, TIB SETIS® sustav bioreaktora, itd.), matični biljni materijal (matičnjak – prijavljen u centru za rasadničarstvo HAPIH), prostor za aklimatizaciju, klima komoru s kontroliranim uvjetima potrebnim za razvoj biljaka u pojedinim fazama mikropropagacije (Slika 7.).

Cilj ovog završnog rada usmjeren je na ispitivanje organogeneze eksplantata borovnice u kulturi tkiva *in vitro*. Tretmani su uključivali dva tipa eksplantata: bazni i vršni dio izdanka. Ispitivan je i utjecaj gustoće, odnosno broja eksplantata po teglici (25 i 50) na organogenezu i multiplikaciju budućih mikroizdanaka *in vitro*.



Slika 7. Postavljanje pokusa u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo, FAZOS

(Izvor: Bošnjak, 2020.)

2.2. Kultivar, postavljanje pokusa i tretmani u istraživanju

Pokus je proveden na kultivaru borovnice „Duke“ koji je uveden u *in vitro* kulturu prijašnjih godina te se na njemu vrše razna druga istraživanja. Porijeklom je iz SAD-a, gdje se počelo uzgajati 1987. godine. Sorta je dobivena križanjem (Ivanhoe x Earliblue) x 192-8 (E 30 x E 11). Duke ima odličnu toleranciju na bolesti, te je jedna od najotpornijih sorti na smrzavanje tokom zimskog perioda. Preporučuje se sadnja do 700 m nadmorske visine, a ako se planira na većim visinama, treba izabrati parcelu koja je zaklonjena od vjetra i koja na proljeće ostaje dugo pod snijegom, odnosno na kojoj kasnije kreće vegetacija. Grm je srednje jakog širokog rasta, a zrioba je srednje rana. Duke je sorta borovnice sa polu podignutim izdancima. Sadnja se obavlja u jesen ili proljeće u posebno pripremljeno zemljište u razmaku od 1,5 x 2,5 m (2.500 kom/ha) ili u saksije/vreće sa profesionalnim supstratom do 6.000 kom/ha.

U ovom istraživanju korišten je polukruti hranjivi medij WPM (Lloyd i McCown, 1980.) proizvođača Duchefa Biochemie B.V., Nizozemska. Detaljan sastav hranjivih podloga korištenih u istraživanju nalazi se u tablici 1.

Tablica 1. Sastav hranjive podloge WPM, (Izvor: Duchefa catalogue, 2010-2012.)

MICRO ELEMENTS		
	mg/l	µM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	1.00
FeNaEDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.30	131.94
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	29.91

MACRO ELEMENTS		
	mg/l	mM
CaCl ₂	72.50	0.65
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	471.26	2.35
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
K ₂ SO ₄	990.00	5.68
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	400.00	5.00

Total concentration Micro and Macro elements: 2358.60 mg/l

VITAMINS		
	mg/l	µM
Glycine	2.00	26.64
myo-Inositol	100.00	554.94
Nicotinic acid	0.50	4.06
Pyridoxine HCl	0.50	2.43
Thiamine HCl	1.00	2.96

Tretmani su uključivali dva tipa eksplantata: bazni dio i vršni dio izdanka (Slika 8.), oba veličine oko 2 cm. Svaki tretman uključivao je 25 i 50 eksplantata (Tablica 2., Slika 9.).

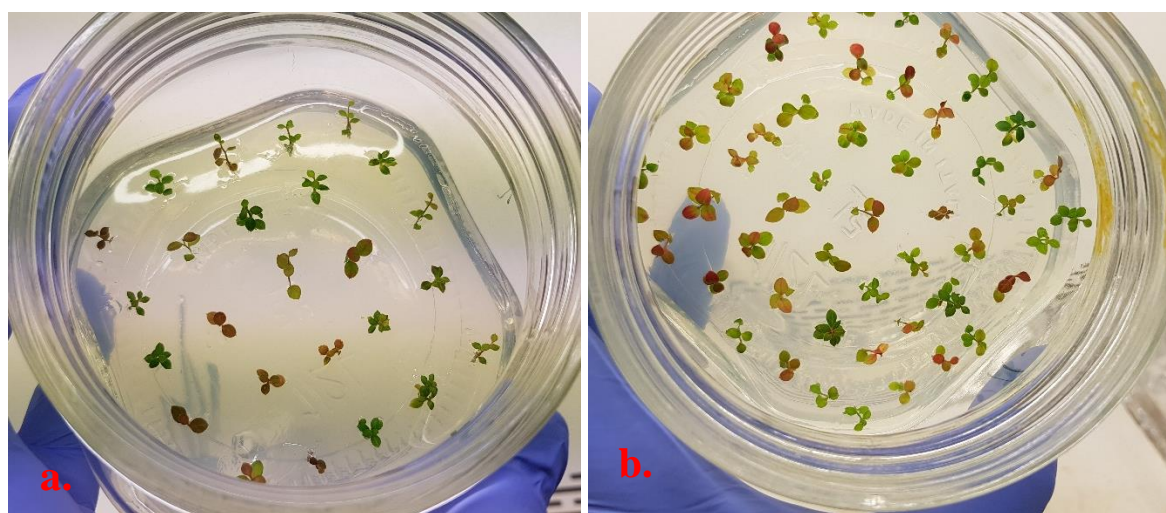
Tablica 2. Tretmani u istraživanju

	Tip eksplantata	Broj eksplantata po teglici
<i>Tretman 1</i>	Vršni dio izdanka	25 i 50
<i>Tretman 2</i>	Baza izdanka	25 i 50



Slika 8. Tip eksplantata: a. vršni dio izdanka i b. baza izdanka, FAZOS, (Izvor: Bošnjak, 2020.)

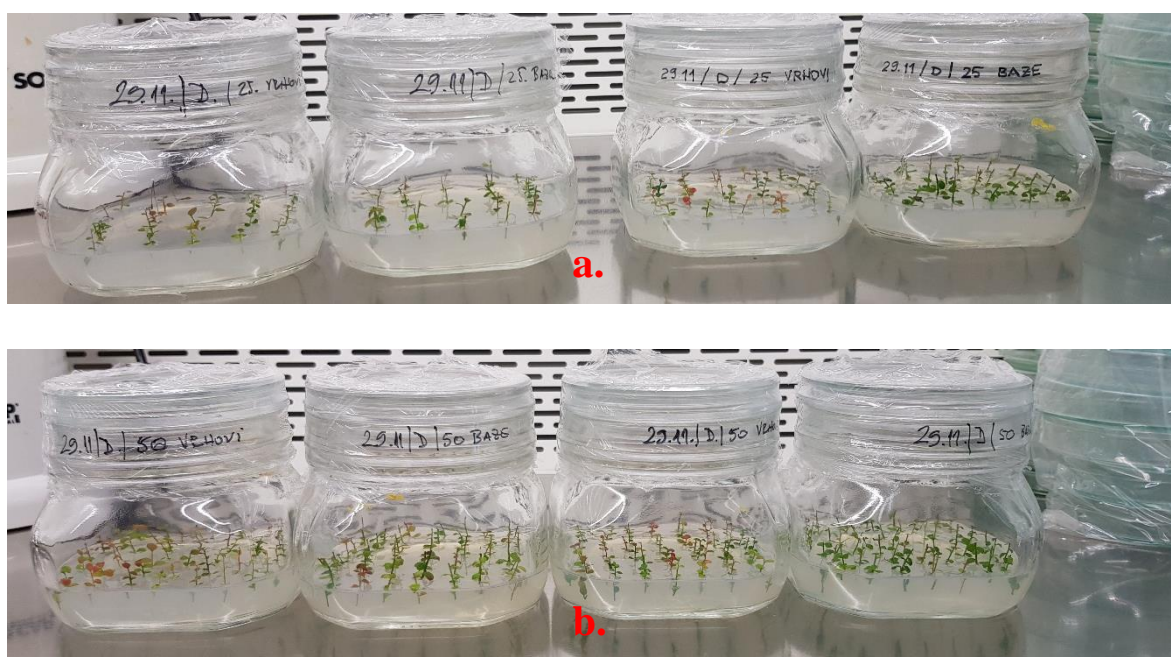
Eksplantati su disecirani na nodijalne segmente veličine oko 2 cm (Slika 8.) unutar aseptičnih uvjeta laminarne komore te su inicirani na hranjivi medij koji je sadržavao navedenu WPM hranjivu podlogu (100 ml) s dodatkom 30 g/l šećera i 2 mg/l zeatina (citokinin), a pH je prije autoklaviranja podešen na 5.0 (acidofilna kultura).



Slika 9. a. 25 eksplantata i b. 50 eksplantata po tretmanu, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

Sav korišteni laboratorijski pribor i hranjivi medij steriliziran je kroz 20 minuta u autoklavu na 121 °C i tlaku od 1.2 bara. Sterilizacija radnog prostora tj. laminarne komore je izvršena 70% etanolom nakon čega se dodatno koristila i UV lampa u trajanju od 60 minuta.

Svaki tretman sadržavao je po 25 i 50 eksplantata unutar teglice (2 x 25 = 50 i 2 x 50 = 100 eksplantata, što u konačnici iznosi 150 eksplantata u istraživanju), (Slika 10.). Po završetku inicijacije eksplantata na polukruti medij, teglice su premještene u prostoriju s kontroliranim uvjetima: temperatura 24 °C i fotoperiod 16/8 (16 sati svjetla, 8 sati mrak). Intenzitet svjetlosti iznosio je 3.850 lux-a.



Slika 10. Završetak inicijacije eksplantata, svi tretmani: a. 25 eksplantata i b. 50 eksplantata, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

2.3. Mjerenja u istraživanju

Nakon 30 dana kulture pristupilo se mjerenju morfoloških parametara i evaluaciji pojedinih tretmana u istraživanju. Mjereni su sljedeći morfološki parametri:

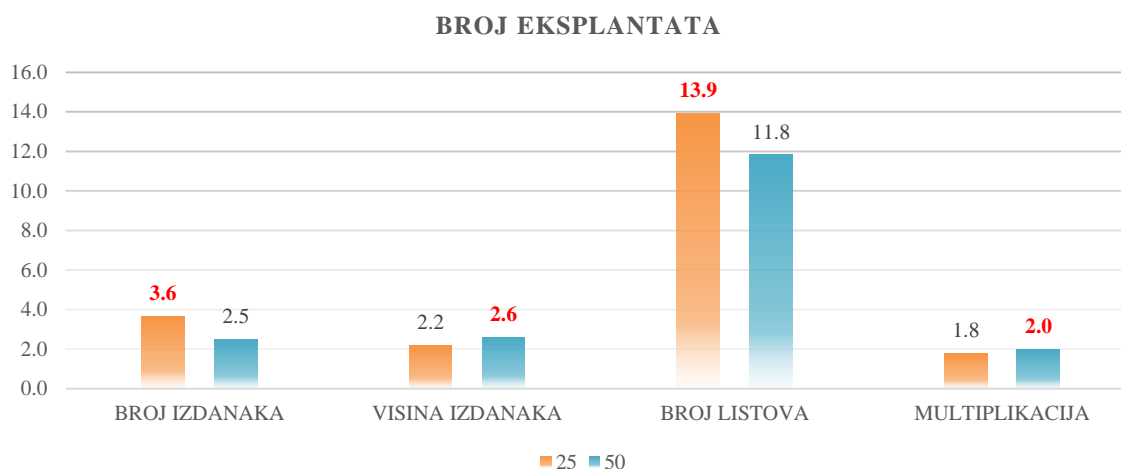
- Broj izdanaka
- Broj listova
- Visina izdanaka
- Multiplikacija

3. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon 30 dana kulture svi tretmani su uspješno, bez tragova kontaminacije ili stresa uspješno inicirali dovoljno biomase za obavljanje mjerenja morfoloških parametara i evaluaciju pojedinih tretmana.

3.1. Utjecaj broja eksplantata na organogenezu borovnice

Prema grafikonu 1. i slici 11., broj izdanaka (3.6) i broj listova (13.9) bio je veći na eksplantatima s manjom gustoćom (25) unutar posude, dok je visina izdanaka (2.6) i multiplikacija (2.0) bila veća na eksplantatima s većom gustoćom (50) unutar posude. Pretpostavljamo da je uslijed veće gustoće eksplantata (50) došlo do elongacije izdanaka uslijed potreba za svjetlosti, dominacije susjednih eksplantata za hranjivima, odnosno skučenosti prostora potrebnog za iniciranje većeg broja izdanaka. Prema dobivenim rezultatima zaključujemo kako veći broj eksplantata unutar *in vitro* posude nema štetan utjecaj za daljnju fazu multiplikacije, čak što više multiplikacija je povećana. Poznato je da se kod borovnice u fazi rizogeneze iniciraju samo pojedinačni cijeli izdanci. U našem istraživanjem dobili smo veće (duže) izdanke uslijed veće gustoće unutar posude koje i je poželjno svojstvo za daljnju fazu rizogeneze. U konačnici obje gustoće inicijacije eksplantata nisu štetno utjecale na organogenezu eksplantata. U cilju smanjenja troškova (agar, medij, fitohormoni, itd.) *in vitro* proizvodnje borovnice, inicijacija većeg broja eksplantata (50) unutar *in vitro* posude nameće se kao idealno rješenje.



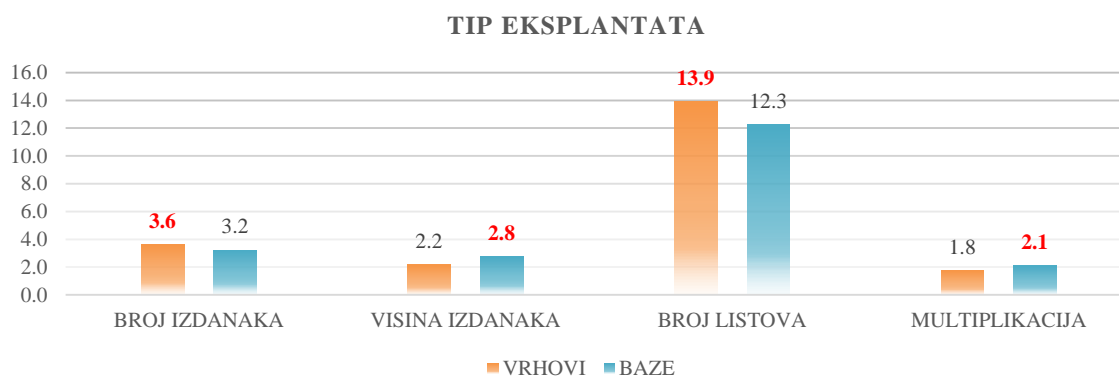
Grafikon 1. Utjecaj broja eksplantata na organogenezu borovnice



Slika 11. Eksplantati unutar *in vitro* posude: lijevo 25 eksplantata, desno 50 eksplantata, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

3.2. Utjecaj tipa eksplantata na organogenezu borovnice

Vršni tip eksplantata (Grafikon 2, Slika 12.) rezultirao je organogenezom većeg broja izdanaka (3.6) s većim brojem listova (13.9), dok je visina izdanaka (2.8) i multiplikacija (2.1) bila veća na baznom tipu eksplantata (Grafikon 2., Slika 13.). Prema dobivenim rezultatima zaključujemo kako nema velike razlike u organogenezi između pojedinih tipova eksplantata borovnice (vršni ili bazni dio), odnosno razlike su minorne. Nastale izdanke s oba tipa eksplantata moguće je uključiti u daljnju fazu multiplikacije. Malu prednost dajemo baznom tipu eksplantata uslijed inicijacije većih izdanaka ukoliko nam se nameće daljnja faza rizogeneze.



Grafikon 2. Utjecaj tipa eksplantata na organogenezu borovnice



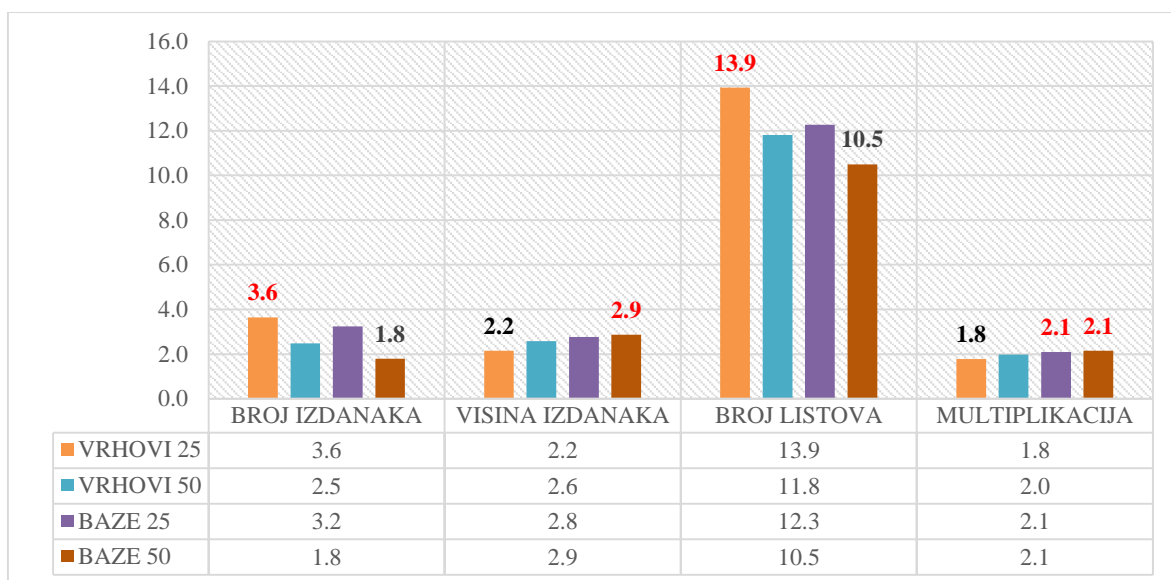
Slika 12. Vršni tip eksplantata: lijevo 25 i desno 50 eksplantata, FAZOS
(Izvor: Bošnjak, 2020.)



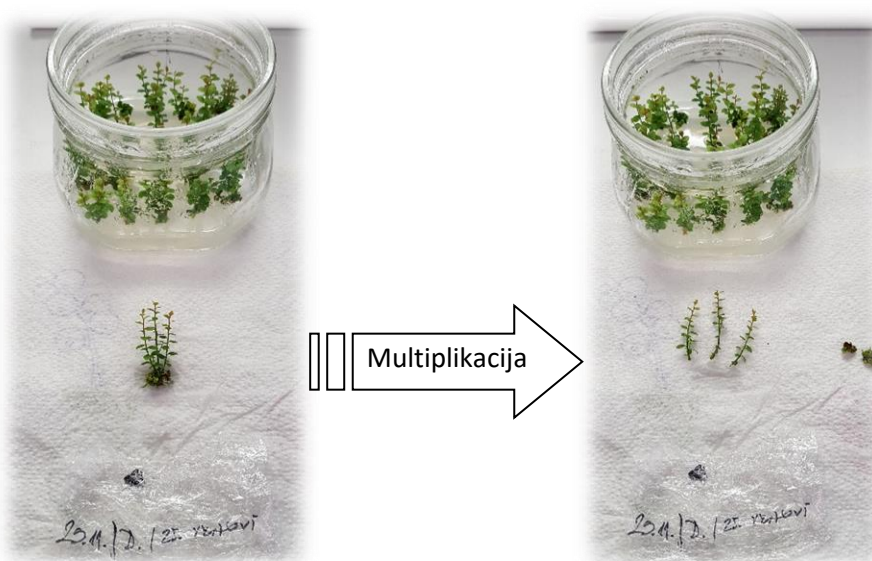
Slika 13. Bazni tip eksplantata: lijevo 50 i desno 25 eksplantata, FAZOS
(Izvor: Bošnjak, 2020.)

3.3. Rezultati na razini cijelog istraživanja

Prema grafikonu 3., vršni tip eksplantata s manjom gustoćom unutar teglice (25) inicirao je najveći broj novih izdanaka (3.6), a samim time i najveći broj listova (13.9) u odnosu na ostale tretmane. Visina izdanka (2.2) na ovom tipu eksplantata i multiplikacija (1.8) je bila najmanja u odnosu na sve ostale tretmane (Slika 14.). Najveća multiplikacija (2.1) i visina izdanka (2.9) nastala je na baznom tipu eksplantata s većom gustoćom (50) unutar *in vitro* posude.



Grafikon 3. Razlike na razini cijelog pokusa – razlike između svih tretmana



Slika 14. Multiplikacija vršnog tipa eksplantata, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

4. ZAKLJUČAK

Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti sljedeće:

- Pokus je postavljen u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek tijekom 2020. godine.
- Cilj ovog završnog rada usmjeren je na ispitivanje organogeneze eksplantata borovnice u kulturi tkiva *in vitro*.
- Tretmani su uključivali dva tipa eksplantata: bazni i vršni dio izdanka.
- Ispitivan je i utjecaj gustoće, odnosno broja eksplantata po teglici (25 i 50) na organogenezu i multiplikaciju budućih mikroizdanaka *in vitro*.
- Nakon 30 dana kulture svi tretmani su uspješno, bez tragova kontaminacije ili stresa uspjeli inicirati dovoljno biomase za obavljanje mjerenja morfoloških parametara i evaluaciju pojedinih tretmana.
- Broj izdanaka i broj listova bio je veći na eksplantatima s manjom gustoćom (25) unutar posude, dok je visina izdanaka i multiplikacija bila veća na eksplantatima s većom gustoćom (50) unutar posude.
- Prema dobivenim rezultatima zaključujemo kako veći broj eksplantata unutar *in vitro* posude nema štetan utjecaj za daljnju fazu multiplikacije, čak što više multiplikacija je povećana.
- Našim istraživanjem dobili smo veće (duže) izdanke uslijed veće gustoće unutar posude koje i je poželjno svojstvo za daljnju fazu rizogeneze.
- U konačnici obje gustoće inicijacije eksplantata nisu štetno utjecale na organogenezu eksplantata.
- Vršni tip eksplantata rezultirao je većim brojem izdanaka i listova, dok je visina izdanaka i multiplikacija bila veća na baznom tipu eksplantata.
- Prema dobivenim rezultatima zaključujemo kako nema velike razlike u organogenezi između pojedinih tipova eksplantata borovnice (vršni ili bazni dio), odnosno razlike su minorne.
- Nastale mikroizdanke s oba tipa eksplantata moguće je uključiti u daljnju fazu multiplikacije.
- Malu prednost dajemo baznom tipu eksplantata uslijed inicijacije većih izdanaka ukoliko nam se nameće daljnja faza rizogeneze.

- U cilju smanjenja troškova (agar, medij, fitohormoni, itd.) *in vitro* proizvodnje borovnice, inicijacija većeg broja eksplantata (50) unutar *in vitro* posude nameće se kao idealno rješenje.

5. POPIS LITERATURE

1. Dale, P.J., Webb, K.J. (1985.): U: SWJ Bright and MGK Jones (Eds.): Cereals Tissue and Cell Culture, Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht, The Netherlands, pp.79-96.
2. Debergh, P., Maene, L. (1981.): Sci. Hortic. 14, 335-345.
3. Ebert, G. (2008.): Uzgoj borovnica i brusnica, Gaudeamus Požega, ISBN: 978-953-7380-05-2.
4. Lloyd, G., McCown (1980.): Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture, B., Int. Plant Prop. Soc. Proc., 30,421.
5. Murashige, T. (1974.): Ann Rev Plant Physiol., 25, 135-166.
6. Sibila, J. (1994.): Kultura biljnih stanica i tkiva – temeljna istraživanja i primjena, Školska knjiga, Zagreb, ISBN: 953-0-31110-1.
7. Smith, D.R. (1986.): U: YPS Bajaj (Ed.): Biotechnology in agriculture and Forestry 2, Trees I., Springer-Verlag, Berlin, pp.274-291.