

# MIKROPROPAGACIJA BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.) U TEKUĆEM IMERZNOM SUSTAVU

---

Lukšić, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2022

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:721887>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-06**



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**

Josip Lukšić

Diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**MIKROPROPAGACIJA BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.)**

**U TEKUĆEM IMERZNOM SUSTAVU**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
**FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK**

Josip Lukšić

Diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**MIKROPROPAGACIJA BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.)  
U TEKUĆEM IMERZNOM SUSTAVU  
Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

**Osijek, 2020.**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	2
2.1. Borovnica – značaj i upotreba .....	2
2.2. Počeci i razvoj uzgoja borovnice .....	3
2.3. Rast i razvoj borovnice – morfološke karakteristike i fiziologija.....	5
2.4. Mikropropagacija borovnice <i>in vitro</i> .....	12
2.4.1. Mikropropagacija borovnice u bioreaktorima.....	15
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	17
3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija.....	17
3.2. Biljni materijal – kultivari u pokusu .....	18
3.3. Postavljanje pokusa i tretmani u istraživanju .....	19
3.4. Mjerenja u istraživanju i obrada dobivenih podataka .....	23
<b>4. REZULTATI</b> .....	24
4.1. Razlike između tretmana na kultivaru Duke.....	24
4.2. Razlike između tretmana na kultivaru Legacy.....	26
<b>5. RASPRAVA</b> .....	28
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	32
<b>7. POPIS LITERATURE</b> .....	33
<b>8. SAŽETAK</b> .....	37
<b>9. SUMMARY</b> .....	38
<b>10. POPIS TABLICA</b> .....	39
<b>11. POPIS SLIKA</b> .....	40
<b>12. POPIS GRAFIKONA</b> .....	41
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b>	
<b>BASIC DOCUMENTACION CARD</b>	

## 1. UVOD

Borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) predstavlja relativno novu intenzivnu voćnu kulturu u RH. Usljed mjera ruralnog razvoja i poticanja od strane EU i RH zabilježeno je povećanje broja proizvođača, a time i površina pod borovnicom.

Slijedom navedenog pojavio se i povećani interes u domaćim rasadnicima za ovom kulturom. Intenzivna rasadničarska proizvodnja borovnice u RH ne postoji te je ona uglavnom bazirana na uvozu deklariranog sadnog materijala iz renomiranih rasadnika susjednih država članica EU (Italija, Francuska, Mađarska, itd.). Moderna rasadničarska praksa razvijenih članica Europske unije u proizvodnji sadnog materijala, temelji se dijelom ili u potpunosti na uporabi suvremenih biotehnoških metoda (mikropropagacija, kultura tkiva *in vitro*). Nije poznato koliko se sadnog materijala u RH proizvede *in vitro* tehnikom, a zastupljenost takvih ustanova, odnosno akreditiranih laboratorija u našoj zemlji je vrlo mala.

Mikropropagacija osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog sadnog materijala u kratkom vremenskom intervalu dok se proizvodnja odvija u kontroliranim i aseptičnim uvjetima. Podizanje razine tehnoloških procesa uvođenjem navedene tehnologije u rasadničarsku praksu naše zemlje nameće se kao imperativ koji je potrebno ostvariti u suradnji s domaćim znanstvenim institucijama.

Konvencionalni *in vitro* model mikropropagacije limitiran je uporabom čvrstih ili polučvrstih medija, odnosno agara koji poskupljuje proizvodnju u odnosu na suvremeni imerzni sustav (bioreaktori). Imerzni sustav bioreaktora koristi tekući hranjivi medij kojeg je moguće mijenjati u svakom trenutku. Sustav ima širok raspon proizvodnje različitog biljnog materijala, biomase, sekundarnih metabolita, potpuno je automatiziran te vrlo brz i efikasan.

Istraživanje o mogućnosti mikropropagacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u tekućem imerznom sustavu provedeno je na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* laboratorij za voćarstvo). Ispitivan je utjecaja određenih koncentracija citokinina zeatina na uspješnost mikropropagacije dva privredno značajna kultivara borovnice Duke i Legacy.

## **2. PREGLED LITERATURE**

### **2.1. Borovnica – značaj i upotreba**

Borovnica pripada među rijetke vrste voća o čijem se podrijetlu i osobinama ne zna baš puno. One ne potječu, kako se obično misli, od domaćih šumskih borovnica već su iz Amerike uvezene u Europu. Plodovi borovnice su plavi, krupni, aromatični, neusporediva okusa, a uz to jako su zdravi jer njihovi brojni sastojci pomažu pri ublažavanju svakodnevnog stresa.

Zbog potrebe za posebnom vrstom tla uzgoj borovnica uglavnom je ograničen na kisela, manje hranjiva šumska i livadska tla. Posljednjih godina se ulažu naponi kako bi se razvile nove sorte i tehnike uzgoja i time omogućilo kultiviranje borovnica na zapuštenim oranicama. Na taj način bi se osigurala veća površina za uzgoj te tako udovoljilo rastućim potrebama tržišta. Svaki proizvođač trebao bi težiti proširivanju ponude ove zanimljive vrste voća. Borovnice mogu postići vrlo dobru cijenu, te mogu konkurirati drugim voćnim vrstama.

Rijetke su biljke s toliko korisnih svojstava kao što su to borovnice. Predmet su zanimanja za amaterski, ali i profesionalni uzgoj te proizvodnju najrazličitijih proizvoda.

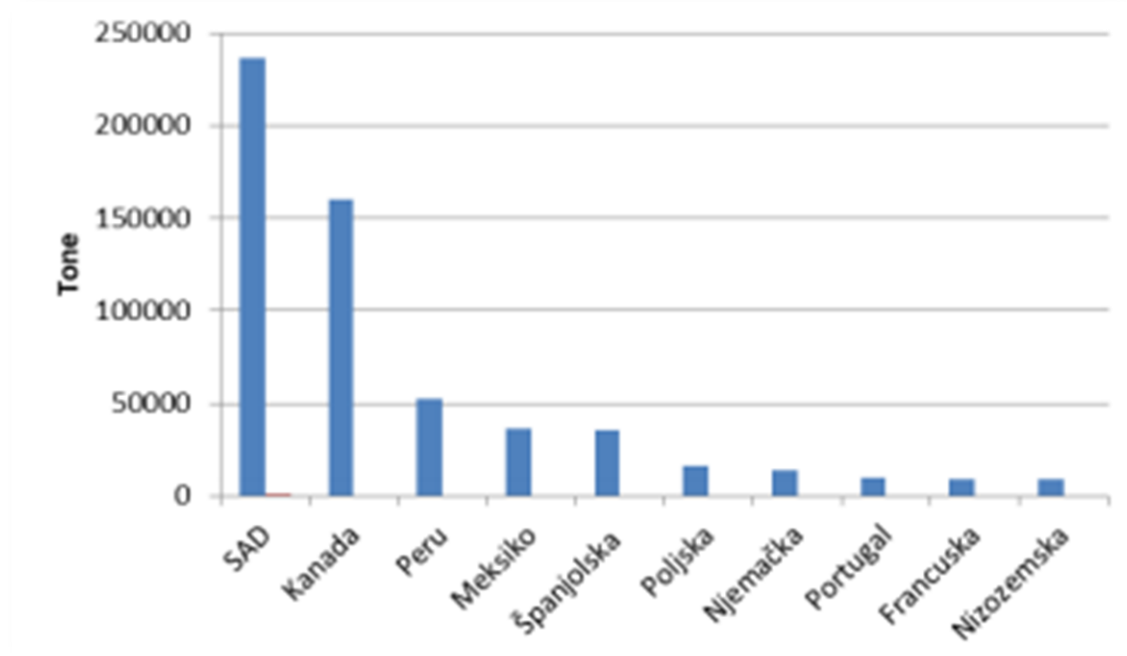
Drevno američko voće, korišteno kao prirodni lijek, danas se nudi tržištu u različitim oblicima: kao organski stopostotni sok s eko certifikatom, sastojak multivitaminskih napitaka, osnovica za sirupe i sokove, tablete protiv infekcija, šumeće tablete, energetske pločice od raznovrsnih žitarica obogaćenih borovnicama, kolača, bombona, čokolade s borovnicom, meda s dodatkom ovih plodova za podizanje energije i jačanje imuniteta, vina od borovnice, borovnice u rakiji, najrazličitije pripremljenih džemova, želea, umaka uz divljač ili druga jela, ali i mnogih drugih proizvoda.

No iznad svega su njihove ljekovite osobine. Zbog velikog sadržaja vitamina C i raznovrsnih minerala, podižu imunitet, korisne su za probavni sustav, pravilno funkcioniranje bubrega i jetre, sniženje šećera u krvi, kolesterola. Pomažu kod stresa, iscrpljenosti, održavaju vitalnost i smatraju se najzdravijim voćem sa vrlo širokom primjenom.

Stoga je posve razumljivo da su se borovnice odavno u Sjevernoj Americi počele uzgajati, a u posljednje vrijeme ovaj uzgoj je sve traženiji i u Europi. Hrvatska također ne zaostaje, borovnica je našla poklonike koji ju uzgajaju u obliku atraktivne lončanice na balkonu, ukrasnog grma u vrtu, ali i unosnih plantaža, odnosno profesionalne proizvodnje.

## 2.2. Počeci i razvoj uzgoja borovnice

Povijest uzgoja borovnica započela je krajem 19. stoljeća, kada su sjevernoamerički farmeri u saveznoj državi Indiana presadili mladice *Vaccinium corymbosum*. Nešto kasnije zasađene su sadnice u južnim američkim zemljama (Florida), no ovdje se radilo o vrsti *Vaccinium ashei*, tzv. Rabbitteye Blueberry (borovnica „zečje oko“) koja voli nešto toplije uvjete. Početak planskog uzgoja vezan je za botaničara Frederica V. Coville koji je 1906. pokrenuo sveobuhvatne programe selekcije. Sadnjom vrsta koje daju dobar urod krupnih plodova površina zasađena borovnicama brzo se širila, poglavito u američkim državama u kojima se i inače uzgaja voće. Trenutno oko 88 % svjetske proizvodnje potječe iz Amerike (Slika 1.).



**Slika 1.** Top 10 proizvođača borovnice u svijetu (Izvor: FAOSTAT)

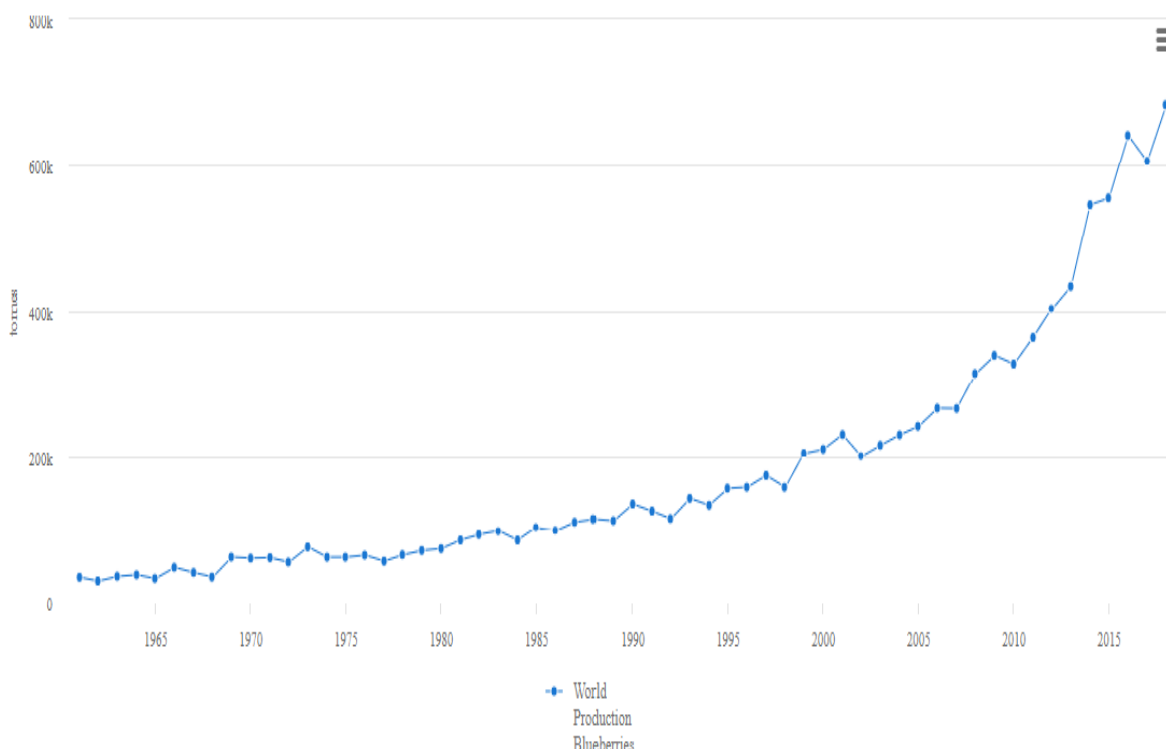
Prvi uzgoj presadnica za potrebe voćarstva u Europi započeo je 1923. godine i to u Nizozemskoj. Borovnica je bila u Europi poznata kao ukrasni grm, poglavito zbog intenzivne crvene boje lišća u jesen.

U Njemačkoj, Wilhelm Heermann tridesetih godina prošlog stoljeća uzgaja hibride koje je dobio križanjem *Vaccinium corymbosum* i *Vaccinium lamarckii*. Time je dobio dvije različite populacije grmova koje je svrstao u *Corymbosum*, tip visokog rasta i

*Pennsylvanicum*, tip niskog rasta. Prva skupina označena je kao plavobijeli zlatni grozdovi, dok su vrste nižeg rasta jako slatkih plodova poznate po nazivu plavobijeli slatki grozdovi. Od tih vrsta kasnije su se razvile sorte „plavobijeli zlatni grozd 71“ i „rekord“.

Godinama su se povećavale površine borovnica, od Njemačke, Poljske, Kanade, Amerike i Čilea. Posebno je zanimljiv uzgoj u Južnoj Americi zbog toga što se tamo voće proizvodi i izvan sezone što jamči opskrbu borovnicama cijele godine. U Australiji i Novom Zelandu također postoje veliki nasadi. Površine na kojima se uzgajaju borovnice u tim zemljama kreću se oko 1000 ha. U Rusiji i baltičkim zemljama pretežno se uzgaja, odnosno bere vrsta *Vaccinium oxycoccus*. U jugozapadnoj Norveškoj uspijevaju sorte borovnica kod kojih period sazrijevanja ne traje tako dugo. U manjem opsegu borovnice se uzgajaju i u Nizozemskoj, Francuskoj, Italiji i Japanu. Kod gotovo svih Europskih zemalja postoji inicijativa uzgoja borovnica, a pokušaja uzgoja bilo je čak i u Saudijskoj Arabiji, gdje vladaju ekstremni klimatski uvjeti.

Teško je reći kolika je svjetska godišnja proizvodnja zbog puno različitih vrsta koje ulaze u zajedničku statistiku, uz to dobar dio berbe potječe iz šuma. Procjene kažu da se godišnje u svijetu pobere oko 300 000 do 400 000 tona (Slika 2.).



**Slika 2.** Kretanje svjetske proizvodnje borovnice 1961. – 2018. (Izvor: FAOSTAT)



Prema zadnjim podacima u Hrvatskoj površine koje su pod borovnicom iznose 88,6 ha. Od sortimenta se koristi Bluecrop, Duke i Patriot. Iz tih podataka zaključuje se kako je proizvodnja borovnice u Hrvatskoj slaba i mizerna iako imamo povoljne uvjete i tlo koje stoji neiskorišteno. Rješenje o unaprjeđenju proizvodnje je poticanje podizanja novih plantaža, educiranje stanovnika s najnovijim dostignućima u uzgoju te uvođenje novih tržišno perspektivnih sorti. Samoniklo najviše raste u Gorskom kotaru i na Velebitu, a može se naći i na Medvednici, Ivanščici, Strahinjščici, Samoborskom gorju, Žumberku, Ličkoj Plješivici, Papuku i Psunju. (Duralija i sur., 2014.; Purgar Dujmović i sur., 2015.)

### 2.3. Rast i razvoj borovnice – morfološke karakteristike i fiziologija

Dok neke *Vaccinium* vrste razvijaju metrima visoke grmove, neke rastu dosta nisko, tek nekoliko centimetara od tla. U rod *Vaccinium* ubrajamo sve vrste bobičastih plodova veličine do 3 cm i s rasponom boje od svijetlocrvene do tamnoplave.

Uzgojne borovnice imaju otporne grmove koji mogu narasti u visinu i do nekoliko metara pri čemu habitus rasta varira od biljke do biljke (Slika 3.). Neke rastu strogo ravno, druge idu više u širinu i izbočenije su. Drvo izbojka je tvrdo i lako lomljivo, a njegova veća ili manja razgranatost ovisi o sorti. Godišnji rast, a time i prinos opada sa starošću biljke jer se cvjetovi osobito razvijaju na vrhovima izbojaka. Tijekom vegetacijskog perioda iz grmne osnove izbijaju novi izboji koji služe za pomlađivanje grma.



**Slika 3.** Grm borovnice (Foto: Lukšić, 2020.)

Korijenje grma borovnice je dosta plitko. Korijeni su vlaknasti, prilično tanki i jako razgranati (Slika 4.). Nemaju korijenovih dlačica koje kod drugih biljnih vrsta imaju veliko značenje pri uzimanju vode i hranjivih tvari iz tla. Rast korijena najsnažnije se odvija na temperaturi između 14 i 18 °C, a ispod 8 °C znatno usporava. Jednako kao i kod ostalih drvenastih biljaka i kod borovnice dvaput dolazi do intenzivnog rasta korijena. U našim klimatskim uvjetima to je početkom lipnja te u rujnu kratko prije, odnosno nakon glavnog rasta izbojaka. Korijenje nije posebno učinkovito pri uzimanju vode tako da grm ne može dobiti dovoljno vlage što usporava njegov rast.



**Slika 4.** Korijenov sustav borovnice (Izvor: <https://eorganic.org/>)

Lišće je na izbojku naizmjenično raspoređeno (Slika 5.). Duguljastog je i zašiljenog oblika, rubovi su kod većine sorta ravni, tek kod ponekih lagano nazubljeni. Veličina listova varira – dok listovi na sporednim izbojcima uglavnom nisu dulji od 5 do 6 cm, na snažnijoj, glavnoj mladici mogu biti dulji od 10 cm. Težina jednog lista kreće se između 0,4 i 0,5 g. Listovi su s obje strane tamnozeleni i goli premda se na nervaturi nešto svjetlije unutarne strane pokazuju dlačice. Na unutarnoj strani lista nalaze se puči, koje po svojoj gustoći od 500 do 600 na mm kvadratne površine jednog lista odgovaraju lišću jabuke ili drugih voćaka. Na grmu borovnice listovi su najrazvijeniji sredinom lipnja. Imaju slab vodeni potencijal što upućuje, zajedno sa slabom učinkovitošću korijena, da grm borovnice ne podnosi tako dobro

sušne periode te da zahtijeva ujednačenu vlažnost tla. Prije no što u kasnu jesen listovi opadnu, dobiju svijetlo crvenu boju što tim grmovima daje visoku ukrasnu vrijednost. Na osnovu njihova različita genetskog podrijetla i rast pojedinih sorta borovnica dosta je raznolik. Npr. rast sorte Nui srednjeg je intenziteta, dok grmovi sorte Spartan rastu znatno brže.



**Slika 5.** Listovi borovnice (Izvor: <https://extension.unh.edu/>)

Cvjetovi se počinju razvijati još u prethodnoj godini. Kod nas se taj period proteže od kraja srpnja pa do početka rujna. Tijekom jesenskih mjeseci rastu i diferenciraju se cvjetni pupovi tako da su na zimu već skoro potpuno razvijeni. Za razliku od košunjicavog voća, indukcija cvjetanja i period sazrijevanja kod borovnica ne događaju se u isto vrijeme. Tijekom indukcije plodovi su već obrani, a vegetativni rast popušta.

Cvjetni pupovi javljaju se pretežito na vrhovima izbojaka, a manjem broju na njihovim osnovama. Borovnica najprije cvate na sporednim izbojcima prvog reda. Cvjetni pupovi mogu se lako prepoznati jer su obliji i jače razvijeni od malih, zašiljenih lisnih pupova.

Jedan cvjetni pup daje i do 12 pojedinačnih cvjetova koji se razvijaju u cvat u obliku gronje (Slika 6.). Neke sorte daju više takvih cvatova iz samo jednog pupa. Poseban cvat, koji izdvaja po tomu što mu donji cvjetovi imaju dulje stapke od gornjih zbog čega i nastaje oblik gronje, botanički se naziva *Corymbus*. Nalazimo ga i u stručnom nazivu za vrstu *Vaccinium corymbosum*.



**Slika 6.** Cvat borovnice (Izvor: <https://garden.org/>)

U srednjoeuropskim klimatskim uvjetima uzgojne borovnice cvatu relativno kasno, glavno cvjetanje je tijekom prva dva tjedna u svibnju. Na temelju razlika u sorti cvjetanje se ovisno o vremenskim uvjetima odvija u periodu od četiri tjedna.

Cvjetni pupovi na vrhovima izbojaka otvaraju se prvi; isto tako tijekom jedne cvatnje cvjetaju prvo gornji pa zatim bazalni cvjetovi. Cvjetna stapka dugo oko 20 mm sastoji se od pet međusobno sraslih cvjetnih latica koje su najčešće blago žućkastobijele ili ružičaste boje. Plodnica je okružen zelenim listićima koji se još uvijek mogu vidjeti kao male kvрге i na plodu tijekom njegova sazrijevanja. Plodnica ima desetke sjemenih zametaka, a svaki cvijet bi ih trebao imati do 80.

Sorte koje pripadaju skupini visokogrmolike borovnice (Highbush Blueberry) same se oplođuju. Jednako kao i kod drugih vrsta voća stranooplodnja djeluje pozitivno na veličinu bobica. Eksperimentima je dokazano da se kod stranooplodnje, u usporedbi sa samooplodnjom, udio krupnijih plodova povećava, a vrijeme sazrijevanja znatno skraćuje. Raniji kvalitativno visok prinos može za uzgajivače imati dosta prednosti. Prema američkim istraživanjima stranooplodnja koja rezultira ranijim sazrijevanjem i povećanjem ploda, u konačnici donosi i veći prihod. Za dobar urod od velikog je značenja što potpunija oplodnja svih sjemenih zametaka. Za oprašivanje su odgovorni insekti, najviše pčele medarice, ali i divlje pčele i bumbari koji također prenose polen.

Oprašivanje vjetrom jedva da ima ikakvu ulogu. Što je više sjemenih zametaka oplođeno, tim brže raste plod, a to ujedno znači i da će biti krupniji.

Količina plodnih zametaka dosta varira. U najboljem slučaju zametne se do 80 % plodova, no prosječno je to ipak nešto manje, oko 50 % do 70 %. Međutim ako se onemogućiti pristup pčelama, npr. postavljanjem mreža preko grmova, zametanje ploda smanjuje se za 20 %. Dolazi do značajnog pada prinosa. Stoga se preporuča postavljanje do pet košnica s pčelama na jedan hektar površine. U nekim pokušajima dobri su rezultati postignuti i sa bumbarima. Bumbari imaju prednost zbog mogućnosti leta na nižim temperaturama nego pčele, a njihovo dulje rilo omogućuje im da dospiju do nektara na dnu cvijeta, za razliku od pčela koje cvijet čvrsto otvaraju sa strane da bi došle do nektara, ali bez dodirivanja polena.

Ne mora uvijek manje sjemena na plodu za posljedicu imati i njegovu manju težinu, jer zbog slabije oplodnje koje za posljedicu ima manji broj bobica na grmu one mogu biti krupnije. Povremeno se mogu naći i plodovi bez sjemena što upućuje na partenokarpni nastanak. Kod njih se nije dogodila oplodnja sjemenih zametaka.

Botanički gledano borovnice su prave bobice jer su potpuno, s iznimkom sjemenki, mesna, te bez drvenastih vlakana. Rast i sazrijevanje ploda protežu se, ovisno o sorti i vremenskim prilikama, na period između 8 i 16 tjedana. Pri tome plodovi prolaze kroz tri razvojne faze. Nakon oplodnje mladi plodovi brzo dobiju na veličini čemu najviše pridonosi dioba stanica u tkivu ploda. Ova faza traje oko četiri tjedna. Premda se čini da je rast prestao jer plod više ne dobiva na težini i veličini, to nije tako jer u unutrašnjosti se prikupljaju rezervne tvari za sjeme, odnosno embrije. Konačno plod opet dobiva na veličini, ali se broj stanica više ne povećava. Stanice sada uzimaju više vode i na taj način se šire. Pri kraju ove faze boja na kori prelazi sa zelene na blijedozelenu, pa ljubičastu i na kraju plavu. Istodobno se mijenjaju

i vrijednosti sastojaka: šećeri se formiraju, odnosno pohranjuju, a suprotno tome kiseline se razgrađuju. Tipične aromatične tvari koje su odgovorne za okus nastaju tek na kraju faze sazrijevanja (Slika 7.).



**Slika 7.** Sazrijevanje bobica borovnice - faze (Izvor: Spinardi i sur., 2019.)

Bjelkasti sloj na plodu nastaje zajedno s promjenom boje od zelene preko ljubičaste pa do plave. Ova presvlaka izazvana je mikroskopski malim česticama voska, koje nastaju u kori ploda, a potom izbijaju na površinu. Za plod ovaj sloj voska ima višestruku zaštitnu ulogu: reflektirajući sunčevu svjetlost čuva tkivo ploda od prevelikog zagrijavanja, sprječava veće gubitke vode i što je neobično važno, štiti ga od prodiranja mikrobnih uzročnika bolesti. Kiša

se na sloju voska skuplja u kapljice zbog čega se plod brzo suši i na taj način smanjuje se opasnost od razvoja gljivičnih zaraza (Ebert, 2008.).

**Slika 8.** Stadij sazrijevanja borovnice (Izvor: Ebert, 2008.)

<b>STADIJ SAZRIJEVANJA (engleski)</b>	<b>STADIJ SAZRIJEVANJA (hrvatski)</b>	<b>STANJE PLODA</b>
<i>IG - immature green</i>	nezrelozeleno	potpuno zelen i tvrd
<i>MG - mature green</i>	zrelozeleno	svijetlozelen do bijel, mekši
<i>GP - green pink</i>	zelenoružičasto	čaška ružičaste boje
<i>BP - blue pink</i>	plavoružičasto	javlja se plava boja, stapka ružičasta
<i>B - blue</i>	plavo	plav, ružičasti prsten na stapki
<i>R - ripe</i>	zrelo	potpuno plav

Za našu ishranu i okus vosak ne igra nikakvu ulogu. Ipak pazi se na to da ga se tijekom berbe ne odstrani, jer svjetloplavi plodovi izgledaju privlačnije, a to je ujedno i znak da se s tim borovnicama pažljivo postupalo. Mjerenja volumena ili težine svježeg ploda kroz tri faze daju naslutiti da se rast zaustavlja kada je plod u srednjoj razvojnoj fazi. Najnovija istraživanja, izvođena svakodnevnim uzimanjem i mjerenjem suhe tvari uzorka, upućuju na to da se rast odvija kontinuirano te da dosta ovisi o vanjskim uvjetima. Iz toga se može vidjeti treba li u određenom trenutku tijekom sazrijevanja ploda posvetiti veću pažnju opskrbi grma vodom i hranjivim tvarima. To će svakako pridonijeti boljem prinosu količinski, a i kvalitativno.

Plodovi borovnice ne sazrijevaju na istom grmu istodobno. Sazrijevanje ploda više ovisi o oplodnji nego o cvjetanju, a prema američkim istraživanjima trajanje sazrijevanja naročito ovisi o broju razvijenog sjemenu. Što je više funkcijski sposobnog sjemena sadržano u jednom plodu, tim je kraći period njegova razvoja. To je potvrđeno i metodom promatranja koja ukazuje da manje bobice često sazriju kasnije od velikih i tu se pokazuje važnost oplodnje, odnosno insekata koji prenose pelud.

Od berbe do berbe smanjuje se i veličina ploda. U prvoj berbi plodovi su najveći, u drugoj berbi se veličina ploda smanjuje na 90 %, u trećoj na 85 %, a u zadnjoj na 70 %. To je utvrđeno nakon jednomjesečne berbe grma Bluecrop sorte. Sazrijevanje plodova podijeljeno je prema američkoj shemi, na šest faza koje se razlikuju po vanjskoj boji ploda (Slika 8.).

Borovnice su, slično kao i jabuke, klimakterijsko voće koje tijekom svoga razvoja dva puta prolazi kroz fazu disanja. Jednom početkom dobivanja plave boje i prijelaza iz stadija GP (green pink) u BP (blue pink), a drugi put tijekom stadija R (ripe), kada je voće već zrelo. Pojedine sorte imaju dosta različito vrijeme i intenzitet klimakterijskog disanja. U fazama snažnije respiracije dolazi do visokih gubitaka vode putem transpiracije što može puno naštetiti kvaliteti ploda. Kroz etilen, odnosno predetilen (ACC) sazrijevanje se može ubrzati, a period berbe skratiti.

Tijekom promjene boje dolazi do brže razgradnje šećera koji pretežito potječu direktno od asimilacijskih listova. Istodobno se razgrađuje i limunska kiselina koja je dominirajuća voćna kiselina. Procesi se odvijaju posebno intenzivno kada plodovi poprime plavu boju što je itekako važno za dojam okusa. Na svakih 0,1 % razgrađene kiseline povećava se slatkoća za 1 %, a upravo ta činjenica je konzumentima posebno važna. Tako na primjer razgradnja kiseline s 1,2 % na 0,6 % odgovara povećanju udjela šećera na 6 %. Usporedno s dobivanjem plave boje plodovi postaju mekši. Do te su točke ostvarili oko 70 % svoje težine (Ebert, 2008.)

#### **2.4. Mikropropagacija borovnice *in vitro***

Borovnica se vegetativno razmnožava na više načina. Iako se ti načini razmnožavanja često koriste njih prate razni problemi i nedostaci. U zadnje vrijeme svjedočimo ekspanziji proizvodnje sadnog materijala tehnikom mikropropagacije, kao i znanjem iz tog područja. Razlog tome je znatno brža proizvodnja i uspješnost stvaranja sadnog materijala (Jelaska, 1994.).

Mikropropagacija je tehnika brzog vegetativnog razmnožavanja biljaka u aseptičnim uvjetima na umjetnoj hranjivoj podlozi pod kontroliranim uvjetima rasta u staklu (*in vitro*). Godišnje se ovom tehnikom može dobiti  $10^4$  do  $10^8$  sadnica od jedne matične biljke. Isplativost same proizvodnje sadnog materijala mikropropagacijom pokazuje i porast novih laboratorija za tu vrstu proizvodnje kao i njihov kapacitet. U Nizozemskoj se podižu laboratoriji s kapacitetom od 5 milijuna sadnica. U toj zemlji većina proizvodnje odnosi se na sadnice cvijeća, dok je vodeća zemlja po proizvodnji voćnih sadnica mikropropagacijom Škotska (Pavlina, 1994.).

Prema istraživanju (Pierik, 1991.) u zapadnoj Europi je glavni proizvođač *in vitro* sadnica Nizozemska na koju otpada 27 % sveukupne proizvodnje. Od sadnog materijala najviše se



mikropropagacijom dobivaju lončanice koje zauzimaju 92 % proizvodnje, a na sitno voće kojem pripada i borovnica otpada 9,35 %.

Pored spomenutih prednosti, proizvodnja sadnog materijala mikropropagacijom ima i niz slabosti. Prilikom prelaska biljaka iz *in vitro* u *in vivo* uvjete stvaraju se brojni problemi poput veliko stvaranje bočnih izdanaka i grmolik izgled sadnica te vraćanje juvenilnog stadija dobivenih biljaka. U *in vivo* uvjetima razvijeno korijenje prestaje biti funkcionalno te se gubi vrijeme na stvaranje novog korijenja koji se prilagođuje novom supstratu i uvjetima. Na otvorenom biljke postaju osjetljivije na biljne bolesti i štetnike što iziskuje znatno povećanje zaštitnih mjera i poskupljuje proizvodnju (Jelaska, 1994.).

Za uspostavljanje kulture tkiva koriste se kako vršni tako i bočni pupovi. Glavni parametar biranja pupova za mikropropagaciju je njihova starost i razvoj (Brissette i sur., 1990.). Do 1980. u svijetu se ovom tehnikom proizvodilo milijun sadnica borovnice (Mohamed i sur., 2018.). Pokazalo se da sadnice dobivene mikropropagacijom stvaraju širi grm tj. imaju veći rodni volumen i prinos u usporedbi s klasičnim vegetativnim razmnožavanjem. Debnath (2007.) iznosi ranije plodonošenje *in vitro* sadnica borovnice, a time i ranijeg vraćanja investicije i početka prihoda proizvođaču. Razmnožavanje borovnica mikropropagacijom je znatno zahtjevnije ali pritom i mnogo efikasnije s obzirom na prinos (Morrison i sur., 2000.).

Pravi početak razmnožavanja *Vaccinium* vrsta kulturom tkiva počinje 1978.-79. godine, a istraživači koji su je proveli bili su Lyrene (1978.) te Cohen i Elliot (1979.). Tijekom vremena istraživači su zaključili da su glavni problemi u mikropropagaciji borovnice utjecaj raznih vrsta hormona i hranjivih podloga na efikasnost stvaranja izdanaka (Lyrene, 1980.; Eccher i Noe, 1989.; Reed i Adbelnour-Esquivel, 1991.; Gonzalez i sur., 2000.; Ostrolucka i sur., 2002.; Tetsumura i sur., 2008.; Jiang i sur., 2009.). Istraživanjem Debnath i McRae (2001.) je utvrđeno da je za borovnicu najpovoljniji medij koji sadrži nisku koncentraciju iona. Lloyd i McCown (1980.) su utvrdili da je za borovnicu najpovoljniji WPM medij. Medij koji se sastojao od kombinacije WPM medija s 20  $\mu$ m zeatina te Murashige i Skoog (1962.) MS medija u omjeru 1:1 se pokazao najboljim za izduživanje izdanaka kod visokogrmolike borovnice (Tetsumura i sur., 2008.). Gonzalez i sur., (2000.) iznose visoku multiplikaciju i izduživanje izdanaka na WPM mediju s 25  $\mu$ M N6-[2-isopentenyl] adenin (2iP). AN medij je nakon WPM medija najčešće korišten u mikropropagaciji visokožbunaste borovnice (Gajdošova i sur., 2006.; Ostrolucka i sur., 2002.; Ostrolucka i sur., 2007.).

Prema Debnathu (2007.) mikropropagaciju borovnice možemo obaviti metodom aksilarnog pupanja ili regeneracijom adventivnih izdanaka. Na kraju obje metode slijede faze ukorjenjivanja i aklimatizacije tj. prijenosa biljaka iz *in vitro* uvjeta u *ex vitro* tj. vanjske uvjete.

Danas se kao početni materijal uzima dio stabljike koji sadrže vršni i bočni pup koji služe kao eksplantati. Najveći problem mikropropagacije borovnice je stvaranje velike količine kalusa pri samoj bazi eksplantata, kao i stvaranje velikog broja adventivnih izbojaka (Zimmerman i Broome, 1980.; Litwińczuk i Szczerba, 1998.). Sam proces razmnožavanja počinje tijekom zime kada prikupljamo zrele reznice koje steriliziramo i skladištimo na mjestu s niskom temperaturom. Osim zrelih reznica koriste se i zelene reznice (Gonzalez i sur., 2000.), eksplantati dobiveni iz sjemena (Lyrene 1980.) i dijelovi korijena (Barker i Collins, 1963.). Sastav hranidbene podloge, vrste i koncentracije hormona prilagođavaju se korištenim kultivarima. Klasični medij WPM kojeg su formulirali Lloyd i McCown (1980.) se pokazao odličan za mikropropagaciju sorte Bluecrop (Wolfe i sur. 1983.). Za vrste *Vaccinium* zeatin se pokazao idealan u inicijaciji i dužini izbojaka (Chandler i Draper, 1986.; Eccher i Noè, 1989.; Reed i Abdelnour-Esquivel, 1991.; Gonzalez i sur., 2000.; Debnath, 2004.) i dužinu izbojaka. S druge strane Gonzalez i sur. (2000.) su dokazali da se mladice visokožbunaste borovnice najbolje multipliciraju primjenom hormona 2iP.

Da je proces proizvodnje sadnica borovnice mikropropagacijom gotov može se reći tek kada izdanke proizvedene *in vitro* premjestimo iz hranjive podloge na supstrat (indukcija adventivnog korijenja *in vitro* ili *ex vitro*). Ukorjenjivanje se odvija u kiselom supstratu kao što je mješavina perlita i treseta (Gonzalez i sur., 2000.) ili mješavina treseta, vermikulita i perlita u omjeru 4:2:1 bez predtretmana auksinom (Morison i sur., 2000.). Prema istraživanju Gonzalez i sur. (2000.) za *ex vitro* ukorjenjivanje sadnica borovnice predtretman auksinom je nepotreban. Prilikom faze ukorjenjivanja *ex vitro* sadnica borovnice neophodno je osigurati vrlo visoku relativnu vlažnost zraka od 95 % što se postiže ovlaživačima zraka tzv. misterima. Nakon toga se sadnice premještaju na aklimatizaciju u zaštićeni prostor (plastenik ili staklenik) gdje je relativna vlaga zraka 85 %. Zimmerman (1987.) iznosi da ukorjenjivanje izdanaka u *ex vitro* uvjetima smanjuje troškove proizvodnje. Negativna strana *ex vitro* ukorjenjivanja je u sporosti rizogeneze u odnosu na *in vitro* (Wolfe i sur., 1983.).

### **2.4.1. Mikropropagacija borovnice u bioreaktorima**

Mikropropagacija borovnice na čvrstom i polučvrstom mediju nije idealna za veliku industrijsku proizvodnju (visoka cijena proizvodnje). S toga se u proizvodnju uvode bioreaktori s tekućom kulturom koji su potpuno automatizirani te su u mogućnosti riješiti određene probleme koje prate konvencionalnu *in vitro* tehniku (Paek i sur., 2005.). Osim toga uporaba bioreaktora omogućuje i dodatnu kontrolu fizikalnih i kemijskih čimbenika kao što su sadržaj CO<sub>2</sub>, jačina svjetla i izmjenu zraka (ventilaciju). Sve to znatno utječe na bolji razvoj biljaka tijekom mikropropagacije (Arencibia i sur., 2008.; Bernal i sur., 2008.; Liu, 2010.). Mikropropagacija putem bioreaktora pokazala se znatno jeftinijom u odnosu na konvencionalnu mikropropagaciju kako zbog opreme tako i zbog održavanja tijekom samog ciklusa. Uslijed kontrole uvjeta primjena bioreaktora omogućuje poboljšanje fizioloških procesa biljke kao npr. fotosinteze u uvjetima *in vitro*. U odnosu na konvencionalni sustav mikropropagacije, sadnice proizvedene u bioreaktorima pokazuju jači stupanj rasta i adaptabilnosti na vanjske *ex vitro* uvjete (Arencibia i Gonzales, 2013.).

Povećanje koncentracije CO<sub>2</sub> i redukcija saharoze tijekom rasta u mediju znatno utječe na povećanje rasta tijekom aklimatizacije u uvjetima *ex vitro* (Kozai i sur., 1995; Janick i Ziv, 2000.). Kao prednosti tekućeg medija još se izdvajaju i veća uniformiranost izdanaka, lako obnavljanje medija, sterilizacija ultrafiltracijom, korištenje velikih kontejnera i time veća proizvodnja, vrijeme postavljanja eksplantata u kulturu je mnogo manje (Debnath, 2010.). Nedostaci tekućeg medija su izmjena plinova kod biljaka što uzrokuje asfiksiju i preveliku hidriranost eksplantata (vitifikacija, hiperhidriranost), a to uzrokuje deformaciju biljnog materijala i sam gubitak eksplantata (Detrez i sur., 1994.). Deformaciju uzrokuju prevelika hidracija listova uslijed čega se poremeti lisna anatomija. Osim toga simptomi vitifikacije očituju se poremećajem u enzimatskim aktivnostima i sintezi proteina, vitifikaciji stanica, smanjenjem klorofila i kutikularnog voska te slabom lignifikacijom (Ziv, 1991.a,b). Rješenje za ovaj problem nameće su u uporabi biljnih retardanata koji bi smanjili izduživanje izdanaka te uporaba TIB imerznih bioreaktora (Ziv i sur., 2003.), (Slika 9.). Debnath (2009.) iznosi tadašnje spoznaje o korištenju bioreaktora u mikropropagaciji borovnice. Prilikom razmnožavanja borovnice u bioreaktoru koristi se tekući medij koji sadrži zeatin u količini od 1 - 2 µm/l. Ukoliko se eksplantati uzgajaju na mediju koji ne sadrži citokinine on stvara samo 1 - 2 slaba izdanka. Kao objašnjenje ove pojave George i Sherrington, (1984.) navode da je najvjerojatnije uzrok u prevelikoj apikalnoj dominaciji. Eksplantati uzgajani na

tekućem mediju u bioreaktoru rezultirali su tri puta većom dužinom izbojaka u odnosu na konvencionalno uzgojene (Debnath, 2009.).



**Slika 9.** TIB sustav bioreaktora SETIS (Izvor: <https://setis-systems.be>)

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija

Cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na ispitivanja mogućnosti mikropropagacije borovnice u tekućem imerznom sustavu bioreaktora. Uspoređivan je utjecaj određenih koncentracija citokinina zeatina na uspješnost multiplikacije i morfološke karakteristike 2 privredno značajna kultivara visokožbunaste borovnice (Duke i Legacy).

Istraživanje je provedeno u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo (Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo) na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS). U laboratoriju se provode razna *in vitro* istraživanja na više voćnih vrsta (lijeska, orah, borovnica, višnja, malina, maslina, trešnja, goji, poncirus, itd.).

U laboratoriju osim edukacije studenata, proizvodi se sadni materijal te provodi znanstveno-istraživački rad. Laboratorij je opremljen svom potrebnom opremom za mikropropagaciju kao što je autoklav, laminar, klima-komora, magnetna mješalica s grijalicom, pH-metar, teglice, skalpeli, sterilizator, pincete, imerzni TIB sustav bioreaktora SETIS (Slika 10.), matičnjak biljnih vrsta, prostor za aklimatizaciju, itd.



**Slika 10.** Imerzni sustav bioreaktora SETIS, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

### 3.2. Biljni materijal – kultivari u pokusu

Izvor biljnog materijala (eksplantati) u ovom istraživanju potječe s *in vitro* biljaka uvedenih u kulturu prethodnih godina na kojem se vrše razna druga istraživanja. Istraživanje je provedeno na dva privredno značajna kultivara borovnice: Duke i Legacy (Slika 11.).

DUKE - Porijeklom je iz SAD-a, gdje se počeo 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 je od najotpornijih sorti na smrzavanje tokom zimskog perioda. Grm je srednje jakog širokog rasta, a zrioba je srednje rana. Duke je sorta borovnice sa polupodignutim izdancima.

LEGACY - sorta borovnice stvorena na sveučilištu Rutgers od strane USDA i NJAES 1993. godine. Cvatnja joj počinje 1. travnja dok sazrijeva i bere se od 30. svibnja do 3. lipnja. Habitus joj je uspravan i bujan s fleksibilnim grančicama koje su obrasle cvjetnim pupovima. Visoko produktivna sorta koja stvara visokokvalitetne plodove. Za svježju potrošnju se može brati i strojno. Zbog svog visokog prinosa i kvalitete ploda ima potencijal da postane vodeća sorta borovnice.



**Slika 11.** Izvor eksplantata, lijevo – Duke, desno – Legacy, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

### 3.3. Postavljanje pokusa i tretmani u istraživanju

U istraživanju je korišten hranjivi medij WPM (Lloyd i McCown, 1980.) proizvođača Duchefa Biochemie B.V., Nizozemska. Detaljan sastav hranjive podloge nalazi se na slici 12. Lloyd i McCown 1980. godine osmislili su i složili ovaj medij tijekom mikropropagacije biljne vrste *Kalmia latifolia*. Od tada do danas medij je eksandirao u jednog od najčešće korištenih medija u mikropropagaciji mnogih biljnih vrsta. Sastoji se od kombinacije vitamina, aminokiselina i anorganskih tvari. U korišteni medij se dodala i saharoza (30 g/l) koja je služila kao izvor ugljika.

**Slika 12.** Sastav hranjive podloge WPM, (Izvor: Duchefa catalogue, 2010-2012.)

#### MICRO ELEMENTS

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

#### MACRO ELEMENTS

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

Laboratorijski pribor (pincete, skalpeli, podloške za disekciju, bioreaktori, crijeva i filteri, voda za hlađenje pribora, itd.) steriliziran je kroz 20 minuta u autoklavu na 121 °C pri tlaku od 1,2 bara. Sterilizacija radnog prostora tj. laminarne komore je izvršena 70 % etanolom

nakon čega se prostor tretirao UV lampa u trajanju od 60 minuta. Nakon sterilizacije pribora, prostora, posuda s medijem i posuda za biljke u aseptičnim uvjetima laminara pristupilo se disekciji i punjenju posuda bioreaktora s eksplantatima. Prilikom pripreme medija, odnosno autoklaviranja pH istog se podesio na vrijednost od pH 5,0.

Tretmani su uključivali različite koncentracije citokinina zeatina (0,5, 1, 2 i 2\* autoklavirani). Poznato je kako citokinin zeatin nije stabilan pri visokoj temperaturi (termolabilan, poništava se efekt) te se iz tog razloga na tretmanima 0,5, 1 i 2 naknadno dodavao u ohlađeni medij (<50 °C) preko hidrofilnog 0,2 µm PTFE syringe filtera. Jedino je tretman s koncentracijom od 2\* ml/l zeatina autoklaviran zajedno s medijem kako bi utvrdili postoji li mogućnost opadanja djelotvornosti zeatina autoklaviranjem (Tablica 1.).

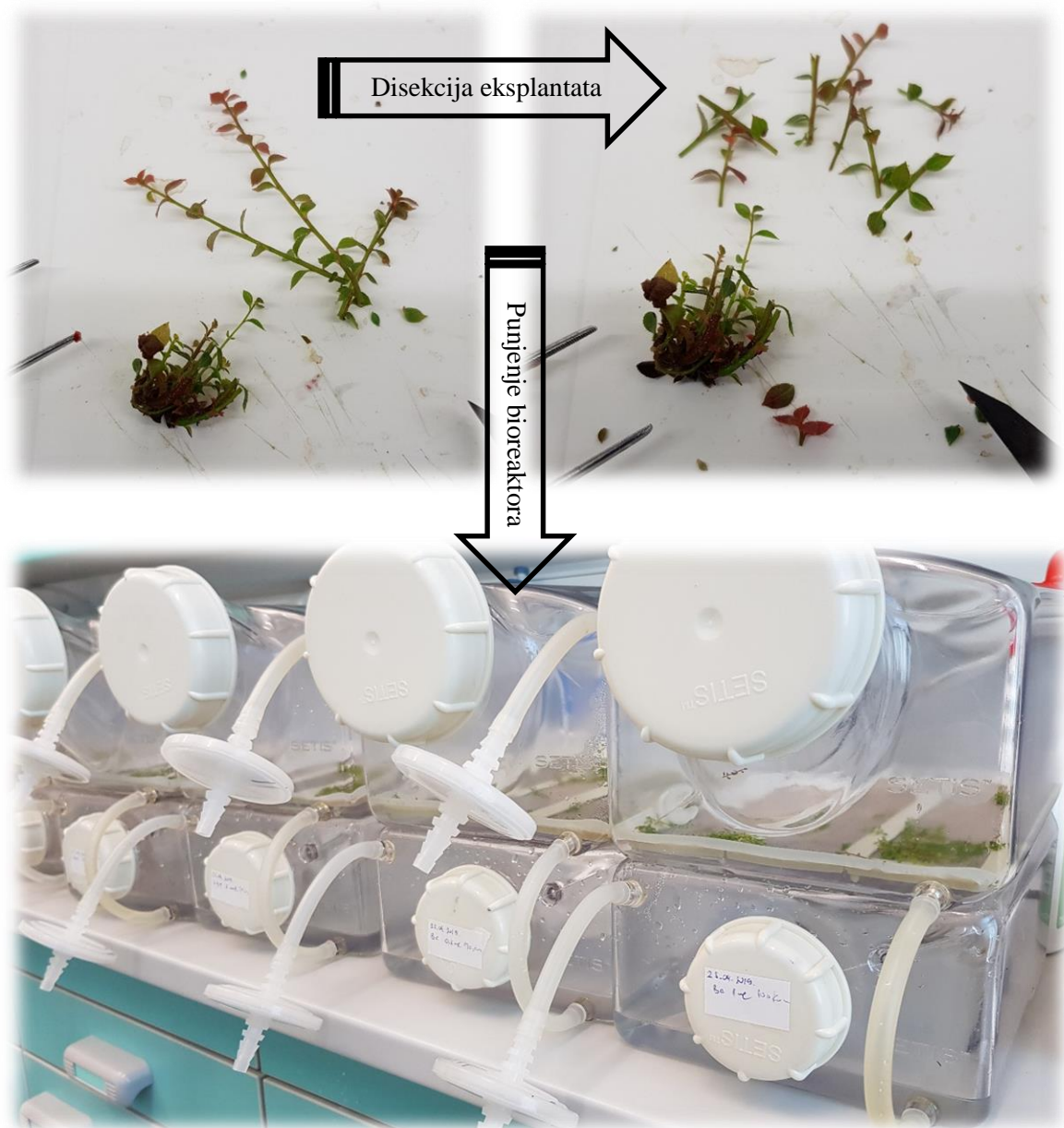
**Tablica 1.** Tretmani u istraživanju

<b>Tretman</b>	<b>Hranjivi medij</b>	<b>Citokinin / koncentracija</b>	<b>Kultivar</b>
<b>T1 – 0.5</b>	<b>WPM</b>	<b>Zeatin 0,5 ml/l</b>	<b>Duke, Legacy</b>
<b>T2 – 1</b>	<b>WPM</b>	<b>Zeatin 1 ml/l</b>	<b>Duke, Legacy</b>
<b>T3 – 2</b>	<b>WPM</b>	<b>Zeatin 2 ml/l</b>	<b>Duke, Legacy</b>
<b>T4 – 2*</b>	<b>WPM</b>	<b>Zeatin 2* ml/l (*autoklaviran)</b>	<b>Duke, Legacy</b>

Zeatin pripada u skupinu fitohormona pod nazivom citokinini. Dobiva se iz purinskog adenina. Otkriven je prvi put u nezrelom zrnu kukuruza. Dokazano je da se nalazi u većim količinama u kokosovu mlijeku koji se prijašnjih godina i koristio u mikropropagaciji u svrhu pospješivanja rasta eksplantata. Razlozi zbog kojih se ova tvar dosta često koristi u mikropropagaciji je dobar utjecaj na formiranje kalusa, (pogotovo ako se kombinira s auksinom) i poticanje aksilarnih izbojaka na rast i proliferaciju. Osim toga koristi se i za poticanje rasta sijanaca kao i za germinizaciju sjemenja.

Eksplantati su disecirani u aseptičnim uvjetima laminarne komore na nodijalne segmente veličine 2 cm do 3 cm (Slika 13.), te su ubačeni u posudu bioreaktora namijenjen biljnom materijalu. Svaki tretman, odnosno bioreaktor sadržavao je 100 eksplantata (ukupno 4 tretmana x 100 biljaka x 2 kultivara = 800 biljaka).

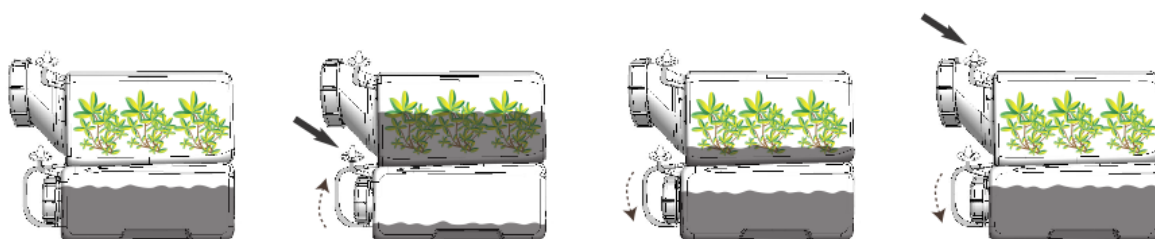




**Slika 13.** Disekcija i bioreaktori s eksplantatima – tretmani, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

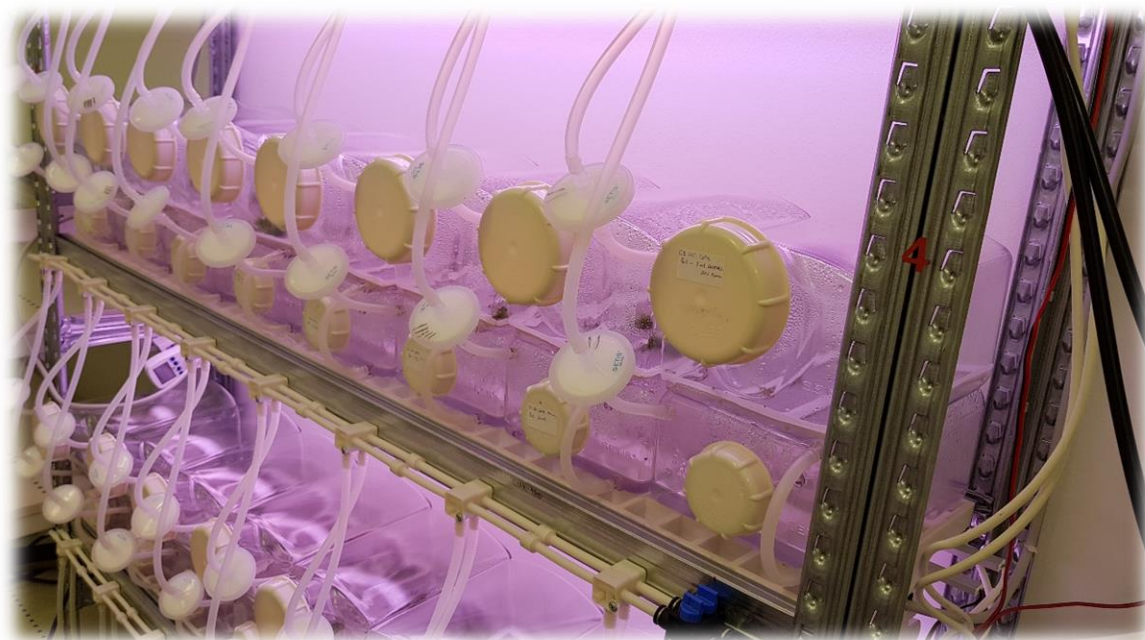
Labaratorij posjeduje suvremeni imerzni sustav (TIB/TIS) bioreaktora belgijskog proizvođača Setis® Vervit. Imerzni bioreaktori TIB (engl. „*Temporary Immersion Bioreactor*“) predstavljaju bioreaktore nove generacije. Glavne prednosti navedenog sustava su visoka učinkovitost te skraćeni ciklus reprodukcije klonskog materijala. Sustav se sastoji od fizički odvojenih posuda s biljkama i posudama s hranjivim medijem koji pomoću pneumatike i kontrolne jedinice (CPU i software) u zadanom ciklusu povremeno potapa biljni materijal s ciljem podmirenja svih životnih potreba (Slika 14.). Jedna od važnih

komponenti TIB sustava je računalna kontrolna upravljačka jedinica – CPU i pneumatska jedinica (kompresor). Pneumatska jedinica mora stvarati vrlo čisti i ne kontaminirani suhi zrak. Veza između pneumatskih elemenata i upravljačke jedinice mora biti savršena kako bi rad bioreaktora bio vrlo precizan i kontroliran. Pomoću kontrolne jedinice automatizira se sam proces i frekvencija, te se odvija kontrola pojedinih faza imerzije, ventilacije, upuhivanja raznih plinova, rasvjete, pH, temperature, potrošnje zraka, itd. Također omogućuje se stvaranje i spremanje svojih vlastitih programa (setup) i sigurnosnih kopija, kao i internetski pristup bazi za kontrolu s bilo kojeg mjesta u svijetu. U našem istraživanju frekvencija imerzije bila je svakih 24 sata (1 x dnevno) sa trajanju od 4 minute i ventilacijom svakih sat vremena (24 x dnevno) u trajanju od 2 minute.



**Slika 14.** Princip rada SETIS imerznog sustava bioreaktora (Izvor: <https://setis-systems.be>)

Nakon što su svi bioreaktori (tretmani) napunjeni s biljnim materijalom isti su postavljeni u klima komoru s kontroliranim uvjetima: temperatura 24 °C i fotoperiodom 16/8 (16 sati svjetlo, 8 sati mrak). Intenzitet svjetlosti u svijetloj fazi iznosio je 3 850 lux-a (Slika 15.).



**Slika 15.** Bioreaktori u klima komori, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

### 3.4. Mjerenja u istraživanju i obrada dobivenih podataka

U ovom istraživanju pristupilo se mjerenju sljedećih promatranih parametara:

- ✚ Broj izdanaka
- ✚ Visina izdanaka
- ✚ Broj listova
- ✚ Multiplikacija

Sva mjerenja izvršena su unutar laboratorija kada su eksplantati dostigli odgovarajuću vegetativnu masu (biomasu), odnosno nakon 30 dana od uspostavljanja kulture (Slika 16.).



**Slika 16.** Mjerenje morfoloških parametara, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

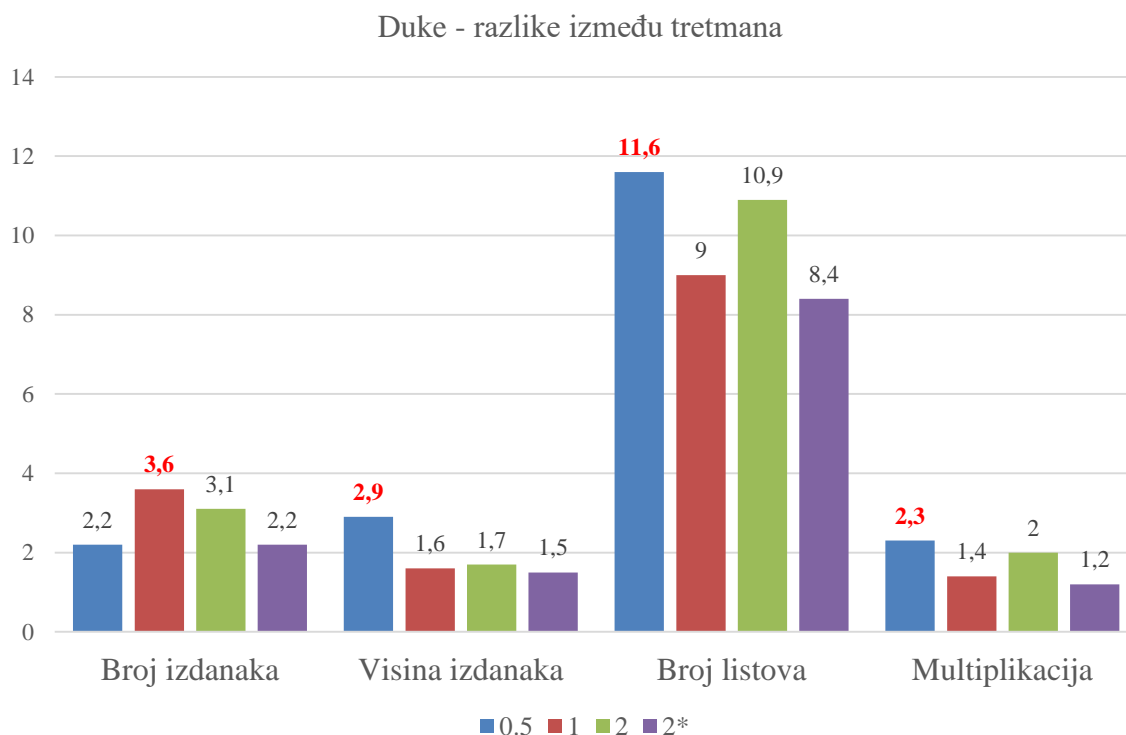
Svi dobiveni rezultati analizirani su pomoću programa za statističku obradu podataka Microsoft Office Excel 2013, SAS Software 9.3. (2002.-2010., SAS Institute Inc., Cary, USA). Od statističkih metoda korištena je analiza varijance (ANOVA), kao i statistički testovi značajnosti za primijenjene tretmane, odnosno F-test i Fisher's LSD (*engl.* Least Significant Difference) u vrijednosti razine od  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Razlike između tretmana na kultivaru Duke

Kao što je vidljivo iz grafikona 1. i slike 17. najveći broj izdanaka kod kultivara Duke dobiven je pri koncentraciji zeatina od 1 ml/l (3,6), zatim 2 ml/l (3,1) i podjednako na 0,5 i 2\* ml/l (2,2). Visina izdanaka bila je najveća pri koncentraciji od 0,5 ml/l (2,9), zatim 2 ml/l (1,7), 1 ml/l (1,6) i 2\* ml/l (1,5) koji je rezultirao najkraćim izdancima. Broj listova pri koncentraciji od 0,5 ml/l (11,6) bio je najveći, zatim 2 ml/l (10,9), 1 ml/l (9) i najmanji pri koncentraciji 2\* ml/l (8,4). Multiplikacija je bila najveća pri koncentraciji 0,5 ml/l (2,3), zatim 2 ml/l (2), 1 ml/l (1,4) i najmanja na 2\* ml/l (1,2) koji uključuje tretman s autoklaviranim zeatinom (Grafikon 1.).

Iz navedenih rezultata (Slika 17. i Grafikon 1.) vidljivo je da su tretmani zeatinom s koncentracijom od 0,5 ml/l rezultirali najvećom visinom izdanaka (2,9), brojem listova (11,6) i multiplikacijom (2,3). Jedino je broj izdanaka bio manji (2,2). Najlošiji rezultati dobiveni su na tretmanu koji je uključivao 2\* ml/l zeatina koji je autoklaviran zajedno s medijem.



**Grafikon 1.** Razlike između tretmana za kultivar Duke

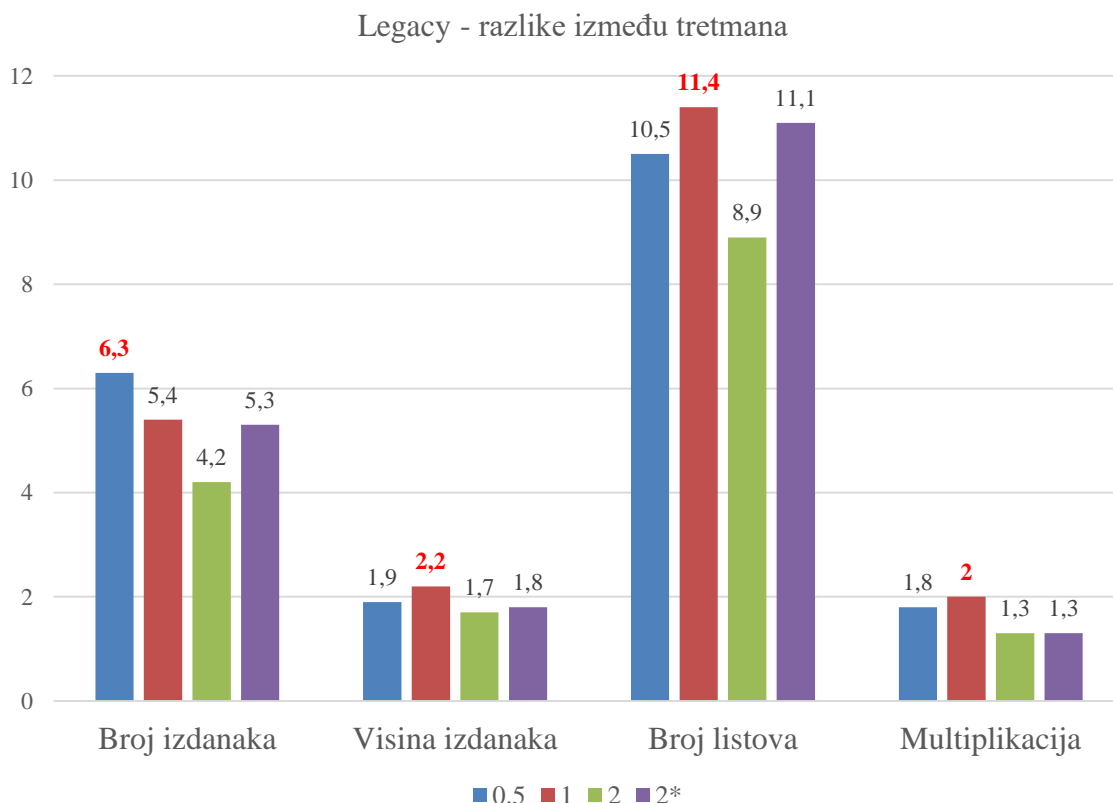


**Slika 17.** Kultivar Duke pri tretmanima: A – 0,5 ml/l, B – 1 ml/l, C - 2 ml/l, D - 2\* ml/l, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

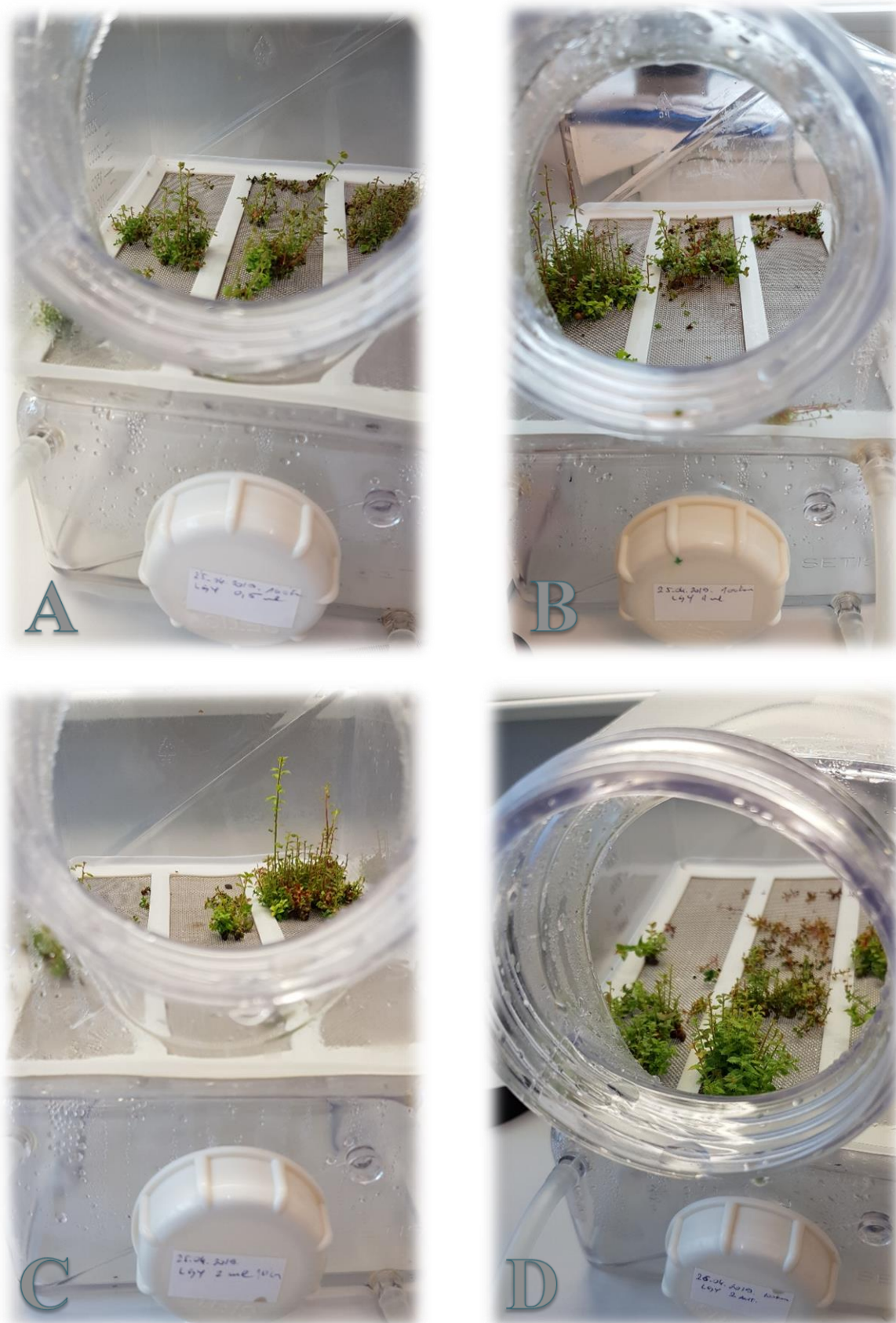
## 4.2. Razlike između tretmana na kultivaru Legacy

Prema grafikonu 2., kultivar Legacy (Slika 18.) rezultirao je najvećim brojem izdanaka pri tretmanu 0,5 ml/l (6,3), zatim 1 ml/l (5,4), 2\* ml/l (5,3) i najmanjim brojem izdanaka pri tretmanu 2 ml/l (4,2). Najveća visina izdanaka zabilježena je pri tretmanu zeatinom s 1 ml/l (2,2), zatim 0,5 ml/l (1,9), 0,5 ml/l (1,8) i najmanja pri tretmanu 2 ml/l (1,7). Broj listova je bio najveći kod tretmana 1 ml/l (11,4), zatim 2\* ml/l (11,1), 0,5 ml/l (10,5) i najmanji pri 2 ml/l (8,9). Najveća stopa multiplikacije zabilježena je također pri tretmanu od 1 ml/l (2), zatim 0,5 ml/l (1,8), a oba tretmana od 2 i 2\* ml/l rezultirali su podjednako s najnižom multiplikacijom (1,3).

Prema iznesenim rezultatima za kultivar Legacy (Grafikon 2. i Slika 18.) koncentracija zeatina od 1 ml/l rezultirala je najučinkovitije po pitanju visine izdanaka (2,2), broja listova (11,4) i multiplikacije (2). Najveći broj izdanaka dobiven je pri tretmanu 0,5 ml/l (6,3) ali i rezultati na ostalim promatranim parametrima su vrlo dobri, odnosno tek nešto manji od rezultata dobivenih pri koncentraciji od 1 ml/l zeatina. Najmanja multiplikacija dobivena je na tretmanu 2\* ml/l zeatina (1,3) koji je bio autoklaviran.



**Grafikon 2.** Razlike između tretmana za kultivar Legacy



**Slika 18.** Kultivar Legacy pri tretmanima: A - 0,5 ml/l, B – 1 ml/l, C - 2 ml/l, D - 2\* ml/l, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

## 5. RASPRAVA

Na razini cijelog pokusa (Tablica 2.) kultivar Legacy rezultirao je značajno većim brojem izdanaka (5,29) dok je multiplikacija bila značajno veća kod kultivara Duke (1,82). Nema značajne razlike u visini izdanaka i broju listova između kultivara.

Iz navedenog zaključujemo kako postoji velika sortna specifičnost, odnosno različiti odgovor između kultivara na primijenjene koncentracije zeatina. Kultivar Legacy inicira vrlo velik broj izdanaka s lošijom multiplikacijom, dok kontrastno kultivar Duke manjim brojem izdanaka ali boljom multiplikacijom. Oba kultivara rezultirala su podjednakom visinom izdanaka i brojem listova. Ako pogledamo detaljnije, kultivar Duke inicirao je malo veće izdanke, a kultivar Legacy malo veći broj listova, ali ne značajno (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Razlike na razini cijelog pokusa između kultivara (Duke i Legacy), tretmana (koncentracija zeatina ml/l: 0,5, 1, 2 i 2\* autoklavirano) te interakcija kultivar x tretman za promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).

Kultivar	Broj izdanaka	Visina izdanaka	Broj listova	Multiplikacija
Duke	2,75 <sup>B</sup>	1,93	9,94	1,82 <sup>A</sup>
Legacy	5,29 <sup>A</sup>	1,90	10,46	1,61 <sup>B</sup>
<i>F-test</i>	129,11	0,26	3,35	12,74
<i>p</i>	<,0001	0,6086	0,0686	0,0004
Tretman				
0,5 ml/l	4,22 <sup>AB</sup>	2,41 <sup>A</sup>	11,02 <sup>A</sup>	2,24 <sup>A</sup>
1 ml/l	4,48 <sup>A</sup>	1,91 <sup>B</sup>	10,16 <sup>B</sup>	1,71 <sup>B</sup>
2 ml/l	3,65 <sup>B</sup>	1,67 <sup>C</sup>	9,85 <sup>B</sup>	1,67 <sup>B</sup>
2* ml/l	3,73 <sup>B</sup>	1,67 <sup>C</sup>	9,75 <sup>B</sup>	1,25 <sup>C</sup>
<i>F-test</i>	3,15	22,28	4,13	46,71
<i>p</i>	0,0259	<,0001	0,0070	<,0001
Interakcija kultivar x tretman				
<i>F-test</i>	8,49	19,44	17,68	37,41
<i>p</i>	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001

\*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: <sup>AB</sup> razina  $p \leq 0,05$

Interakcija kultivar x tretman bila je značajna za sve promatrane parametre. Što se tiče tretmana zeatina, odnosno koncentracija, najveći broj izdanaka nastao je pri tretmanu s 0,5 i



1 ml/l (4,22 i 4,48) između kojih nije bilo značajne razlike. Obje koncentracije značajno su bolje po pitanju broja izdanaka u odnosu na koncentraciju od 2 ml/l. Visina izdanaka (2,41), broj listova (11,02) i multiplikacija (2,24) bila je značajno bolja na tretmanu s 0,5 ml/l u odnosu na ostale primijenjene koncentracije (Tablica 2.).

**Tablica 3.** Razlike između kultivara (Duke i Legacy) po tretmanima zeatinom (0,5, 1, 2 i 2\* ml/l) na promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).

	<b>Broj izdanaka</b>	<b>Visina izdanaka</b>	<b>Broj listova</b>	<b>Multiplikacija</b>
<b>0,5 ml/l</b>				
<i>Duke</i>	2,17 <sup>B</sup>	2,88 <sup>A</sup>	11,58	2,72 <sup>A</sup>
<i>Legacy</i>	6,27 <sup>A</sup>	1,94 <sup>B</sup>	10,47	1,76 <sup>B</sup>
<i>F-test</i>	51,49	35,78	3,01	38,97
<i>p</i>	<,0001	<,0001	0,0880	<,0001
<b>1 ml/l</b>				
<i>Duke</i>	3,57 <sup>B</sup>	1,63 <sup>B</sup>	8,97 <sup>B</sup>	1,41 <sup>B</sup>
<i>Legacy</i>	5,40 <sup>A</sup>	2,19 <sup>A</sup>	11,35 <sup>A</sup>	2,01 <sup>A</sup>
<i>F-test</i>	16,02	8,83	16,07	16,62
<i>p</i>	0,0002	0,0043	0,0002	0,0001
<b>2 ml/l</b>				
<i>Duke</i>	3,07 <sup>B</sup>	1,69	10,83 <sup>A</sup>	2,02 <sup>A</sup>
<i>Legacy</i>	4,23 <sup>A</sup>	1,65	8,88 <sup>B</sup>	1,33 <sup>B</sup>
<i>F-test</i>	9,93	0,10	16,42	77,15
<i>p</i>	0,0026	0,7549	0,0002	<,0001
<b>2* ml/l</b>				
<i>Duke</i>	2,20 <sup>B</sup>	1,54 <sup>B</sup>	8,36 <sup>B</sup>	1,15 <sup>B</sup>
<i>Legacy</i>	5,27 <sup>A</sup>	1,80 <sup>A</sup>	11,13 <sup>A</sup>	1,34 <sup>A</sup>
<i>F-test</i>	73,93	4,38	24,97	6,37
<i>p</i>	<,0001	0,0407	<,0001	0,0143

\*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: <sup>AB</sup> razina  $p \leq 0,05$

Prema tablici 3. kultivar Legacy je inicirao značajno veći broj izdanaka (6,27, 5,40, 4,23, 5,27) u odnosu na kultivar Duke na svim tretmanima zeatinom (0,5, 1, 2 i 2\* ml/l). Nije utvrđena značajna razlika u broju listova između kultivara pri koncentraciji od 0,5 ml/l. Na istoj koncentraciji zeatina od 0,5 ml/l kultivar Duke rezultirao je značajno većom visinom

izdanaka (2,88) i multiplikacijom (2,72). Kultivar Legacy na tretmanima od 1 ml/l i 2\* ml/l rezultirao je značajno većim izdancima (2,19 i 1,80), brojem listova (11,35 i 11,13) i multiplikacijom (2,01 i 1,34). Nije zabilježena značajna razlika u visini izdanaka između kultivara na tretmanu s 2 ml/l zeatina.

**Tablica 4.** Razlike u učinkovitost između tretmana zeatinom (0,5, 1, 2 i 2\* ml/l) po kultivarima (Duke i Legacy) na promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).

	<b>Broj izdanaka</b>	<b>Visina izdanaka</b>	<b>Broj listova</b>	<b>Multiplikacija</b>
<b>Duke</b>				
<b>0,5 ml/l</b>	2,17 <sup>B</sup>	2,88 <sup>A</sup>	11,58 <sup>A</sup>	2,72 <sup>A</sup>
<b>1 ml/l</b>	3,57 <sup>A</sup>	1,63 <sup>B</sup>	8,97 <sup>B</sup>	1,41 <sup>C</sup>
<b>2 ml/l</b>	3,07 <sup>A</sup>	1,69 <sup>B</sup>	10,83 <sup>A</sup>	2,02 <sup>B</sup>
<b>2* ml/l</b>	2,20 <sup>B</sup>	1,54 <sup>B</sup>	8,36 <sup>B</sup>	1,14 <sup>D</sup>
<i>F-test</i>	10,21	50,08	15,93	70,73
<i>p</i>	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
<b>Legacy</b>				
<b>0,5 ml/l</b>	6,27 <sup>A</sup>	1,94 <sup>AB</sup>	10,47 <sup>A</sup>	1,76 <sup>B</sup>
<b>1 ml/l</b>	5,40 <sup>A</sup>	2,19 <sup>A</sup>	11,35 <sup>A</sup>	2,01 <sup>A</sup>
<b>2 ml/l</b>	4,23 <sup>B</sup>	1,65 <sup>B</sup>	8,88 <sup>B</sup>	1,32 <sup>C</sup>
<b>2* ml/l</b>	5,27 <sup>AB</sup>	1,80 <sup>B</sup>	11,13 <sup>A</sup>	1,34 <sup>C</sup>
<i>F-test</i>	4,51	3,77	6,88	15,07
<i>p</i>	0,0050	0,0127	0,0003	<,0001

\*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: <sup>AB</sup> razina  $p \leq 0,05$

Kod kultivara Duke koncentracija, odnosno tretman s 0,5 ml/l zeatina rezultirao je značajno većim izdancima (2,88), multiplikacijom (2,72) i brojem listova (11,58) u odnosu na ostale primijenjene tretmane. Broj izdanaka na tretmanu od 1 i 2 ml/l zeatina rezultirao je značajno većim brojem izdanaka kultivara Duke u odnosu na ostale tretmane. Najmanja stopa multiplikacije (1,14), odnosno značajno manja u odnosu na sve tretmane bila je pri 2\* ml/l zeatina. Pretpostavljamo kako je djelotvornost ili učinkovitost zeatina opala uslijed izlaganja istog visokoj temperaturi (120 °C) autoklaviranja (Tablica 4.).

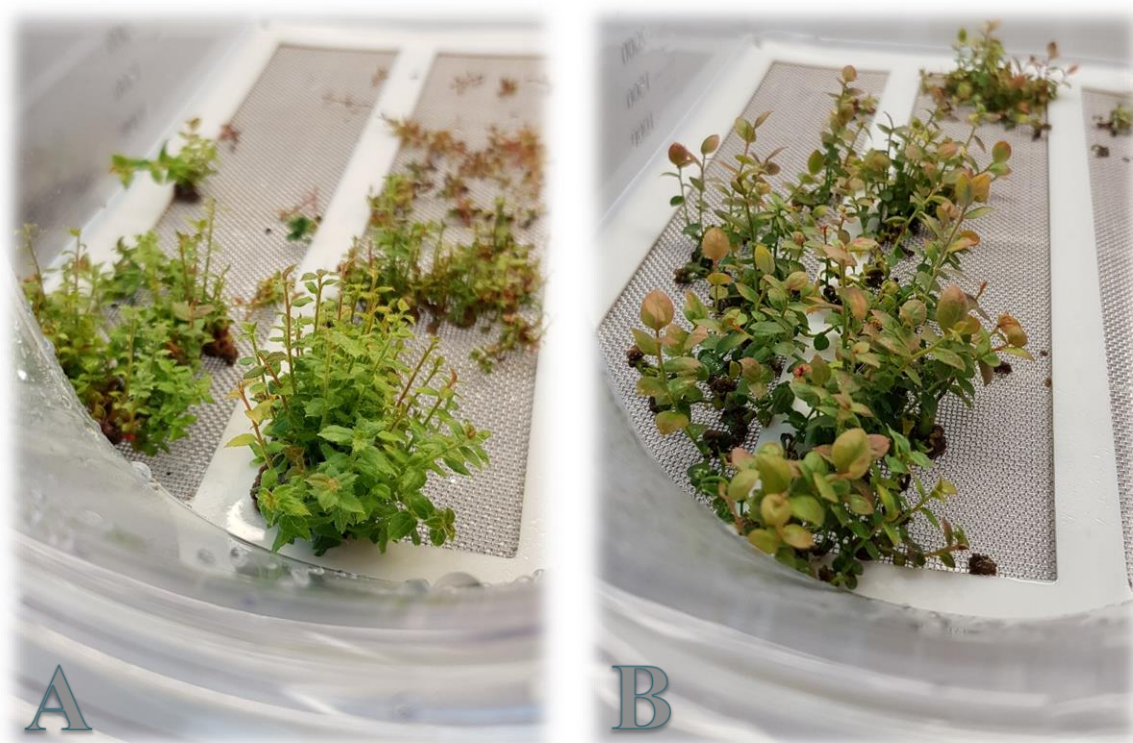
Kultivar Legacy je na tretmanu s 1 ml/l zeatina rezultirao značajno većom stopom multiplikacije (2,01) u odnosu na sve ostale primijenjene tretmane. Također koncentracija

od 1 ml/l zeatina rezultirala je značajno većom visinom izdanaka (2,19), brojem izdanaka (5,40) i listova (11,35) u odnosu na tretman s 2 ml/l zeatina. Nema značajne razlike između koncentracija 0,5, 1 2\* ml/l u broju izdanaka i listova (Tablica 4.).

Prema dobivenim rezultatima manje koncentracije zeatina od 0,5 i 1 ml/l rezultirale su boljim morfološkim parametrima i stopom multiplikacije kod kultivara Legacy. Također i na kultivaru Duke najmanja koncentracija, odnosno tretman zeatinom od 0,5 ml/l bio je najučinkovitiji (Slika 19.).

Tretman koji je uključivao zeatin od 2\* ml/l te bio autoklaviran nije rezultirao zadovoljavajućim uspjehom. Lošu učinkovitost pripisujemo navodima o opadanju djelotvornosti zeatina u mikropropagaciji uslijed izlaganja velikoj temperaturi autoklavliranja.

Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti na ispitivanja učinka različitih frekvencija imerzije i ventilacije u mikropropagaciji borovnice u tekućem imerznom sustavu. Također i detaljnije pristupiti utvrđivanju pretpostavke opadanja djelotvornosti zeatina uslijed autoklavliranja.



**Slika 19.** Najučinkovitiji tretmani: A – Legacy 1 ml/l i B – Duke 0,5 ml/l zeatina, FAZOS

(Foto: Bošnjak, 2020.)

## 6. ZAKLJUČAK

Na Fakultetu agrobotehničkih znanosti Osijek (2020. godina) provedeno je ispitivanje uspješnosti mikroporpagacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u tekućem imerznom sustvu kroz analizu morfoloških parametara. Cilj istraživanja bio je odrediti optimalne koncentracije koncentracije hormona citokinina (zeatin) u mikroporpagaciji kultivara borovnice Duke i Legacy.

- Utvrđena je značajna varijabilnost između kultivara u odgovoru na primijenjene tretmane.
- Interakcija kultivar x tretman bila je značajna za sve promatrane parametre.
- Na razini cijelog pokusa kultivar Legacy rezultirao je značajno većim brojem izdanaka dok je multiplikacija bila značajno veća kod kultivara Duke.
- Najveći broj izdanaka nastao je pri tretmanu s 0,5 (Duke) i 1 ml/l (Legacy) zeatina između kojih nije bilo značajne razlike.
- Kod kultivara Duke koncentracija, odnosno tretman s 0,5 ml/l zeatina rezultirao je značajno većim izdancima, multiplikacijom i brojem listova u odnosu na ostale primijenjene tretmane. Najmanja stopa multiplikacije bila je pri 2\* ml/l zeatina.
- Kultivar Legacy je na tretmanu s 1 ml/l zeatina rezultirao značajno većom stopom multiplikacije u odnosu na sve ostale primijenjene tretmane.
- Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti na ispitivanja učinka različitih frekvencija imerzije i ventilacije tijekom mikropropagacije borovnice u tekućem imerznom sustavu.
- Detaljnije pristupiti utvrđivanju djelotvornosti zeatina kroz analizu medija da bi se utvrdila postojanost koncentracije nakon autoklaviranja.

## 7. POPIS LITERATURE

Arencibia, A. D., Bernal, A., Yang., L., Cortegaza, L., Carmona, E.R., Pérez, A., Hu, C.J., Li, Y.R., Zayas C.M., Santana, I. (2008.): New Role of Phenylpropanoid Compounds during Sugarcane Micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs), *Plant Sciences*, 175:4:487-496.

Arencibia, A.D., Gonzales, G.R. (2013.): An Approach for Micropropagation of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Plants Mediated by Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *American Journal of Plant Sciences*, 4:1022-1028.

Barker, W.G., Collins, W.B. (1963.): The blueberry rhizome: In vitro culture, *Can. J. Bot.* 41:1325-1329.

Bernal, A., Machado, P., Carmona, E.R., Rivero, O., Cortegaza, L., Cabrera, M., Zayas, C.M., Nodarse, O., Santana I., Arencibia, A.D. (2008.): Priming and Biopriming Integrated into the Sugarcane Micropropagation Technology by Temporary Immersion Bioreactors (TIBs), *Sugar Technology*, 10:1:42-47.

Brissette, L., Tremblay, L., Lord, D. (1990.): Micropropagation of lowbush blueberry from Mature Fieldgrown Plants. *HortScience* 25(3):349-351.

Chandler, C.K., Draper, A.D. (1986.): Effect of zeatin and 2iP on shoot proliferation of three highbush blueberry clones in vitro, *HortScience*, 21:1065-1066.

Cohen, D., Elliot, D. (1979.): Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 29:177-179.

Debnath, S.C., McRae, K.B. (2001.): In vitro culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), *Small Fruits Review*, 1(3):3-19.

Debnath, S.C. (2004.): In vitro culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.), *Small Fruits Review*, 3:393-408.

Debnath, S.C. (2007.): Propagation of *Vaccinium* in Vitro, *International Journal of Fruit Science*, 6:2:47-71.

Debnath, S.C. (2009.): A Scale-Up System for Lowbush Blueberry Micropropagation Using a Bioreactor, *HortScience*, 44:7:1962-1966

Debnath, S.C. (2010.): Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation - A review, *Can. J. Plant Sci.*, 91:147-157.

- Detrez, C., Ndiaye, S., Dreyfus, B. (1994.): In vitro regeneration of the tropical multipurpose leguminous tree *Sesbania grandiflora* from cotyledon explants, *Plant Cell Rep.*, 14:87-93.
- Duchefa Catalogue (2010-2012): Plant Cell and Tissue Culture, Phytopatology, Biochemicals, Duchefa Biochemie B.V., Netherlands..
- Duralija, B., Mešić, A., Njavro, M. (2004.): Berry fruit industry in Croatia, 29th International Horticultural Congress.
- Dujmović Purgar, D., Šindrak, Z., Mihelj, D., Voća, S., Duralija, B. (2015.): Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj, *Pomologia Croatica*, 13:4.
- Ebert, G. (2008.): Uzgoj borovnica i brusnica, Gaudeamus Požega, ISBN: 978-953-7380-05-2.
- Gajdošova, A., Ostrolucka, M.G., Libiakova, G., Ondruškova, E., Šimala, D. (2006.): Microconal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture in vitro. *J. Fruit Ornam. Plant Res.*, 14:103-119.
- Eccher, T. Noè, N. (1989.): Comparison between 2iP and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*), *Acta Hort.*, 441:185-190.
- George, E.F., Sherrington, P.D. (1984.): *Plant Propagation by Tissue Culture - Handbook and Directory of Commercial Laboratories*, Exegetics Ltd., Edington.
- Gonzalez, M.V., Lopez, M., Valdes, A.E., Ordas, R.J. (2000.): Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field grown plant, *Ann. Appl. Biol.*, 137:73-78.
- Janick, J., Ziv, M. (2000.): *Bioreactor Technology for Plant Micropropagation*, Horticulture Review, John Wiley & Sons, Inc, New York, vol.4.
- Jiang, Y., Yu, H., Zhang, D., He, S., Wang, Ch. (2009.): Influences of media and cytokinins on shoot proliferation of 'Brightwell' and 'Choice' blueberries in vitro, *Acta Horticulturae*, 810:581-586.
- Kozai, T., Jeong, R., Kubota, C., Murai, Y. (1995.): Effects of Volume and Initial Strength of Medium on the Growth, Photosynthesis and Ion Uptake of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plantlet in Vitro, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 64:1:63-71.
- Liu, Y., Zambrano, C.J., Hu, E.R., Carmona, A., Bernal, A., Pérez, Y.R., Li, A., Guerra, I.S., Arencibia, A.D. (2010.): Sugarcane Metabolites Produced in CO<sub>2</sub>-Rich Temporary

Immersion Bioreactors (TIBs) Induce Tomato (*Solanum lycopersicum*) Resistance against Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*), *In Vitro Cell Development Plant*, 46:6:558- 568.

Litwińczuk, W., Szczerba, J. (1998.): The growth and development of highbush blueberry cultures (*Vaccinium corymbosum* L. Cv. Bluecrop) under different light.

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.

Lyrene, P.M. (1978.): Blueberry callus and shoot-tip culture. *Proc. Florida State Hort.*, 91:171-172.

Lyrene, P.M. (1980.): Micropropagation of rabbiteye blueberries. *HortScience*, 15:80-81.

Mohamed, G.R.A.E., Hugo, B., Zavdetovna, K.L., Arnoldovna, T.O. (2018.): A research approach supporting micropropagation and domestication of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Egypt, *Eurasia J Biosci* 12:205-210.

Morrison, S., Smagula, J.M., Litten, W. (2000.): Morphology, growth, and rhizome development of *Vaccinium angustifolium* Ait. seedlings, rooted softwood cuttings, and micropropagated plantlets, *HortScience*, 35:738-741.

Murashige, T., Skoog, F. (1962.): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3):473–497.

Ostrolucka, M.G., Gajdošova, A., Libiakova, G. (2002.): Influence of zeatin on microclonal propagation of *Vaccinium corymbosum* L., *Propag. Ornam. Plants*, 2:14-18.

Ostrolucka, M.G., Gajdošova, A., Libiakova, G., Hrubikova, K., Bežo, M. (2007.): Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. p.445-455. In: S.M. Jain and H. Haggman (eds.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, The Netherlands.

Pavlina, R. (1994.): Mikropropagacija: mogućnosti njene primjene u hrvatskoj poljoprivredi, *Sjemenarstvo*, 11(5):317-326.

Paek, K.Y., Chakrabarty, D. Hahn, E.J. (2005.): Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 81:287-300.

Pierik, R.L.M. (1991.): Micropropagation of ornamental plants, *Acta Horticulture*, 289:45-55.

Reed, B.M., Adbelnour-Esquivel, A. (1991.): The use of zeatin to initiate in vitro cultures of *Vaccinium* species and cultivars. HortScience, 26:1320-1322.

Sibila, J. (1994.): Kultura biljnih stanica i tkiva – temeljna istraživanja i primjena, Školska knjiga, Zagreb, ISBN: 953-0-31110-1.

Spinardi, A., Cola, G., Gardana, C.S., Mignani, I. (2019.): Variation of Anthocyanin Content and Profile Throughout Fruit Development and Ripening of Highbush Blueberry Cultivars Grown at Two Different Altitudes. Front. Plant Sci., 10:1045.

Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Sugimoto, Y., Kunitake, H. (2008.): Evaluation of basal media for micropropagation of four blueberry cultivars. Sci. Hortic., 119:72-74.

Zimmerman, R.H., Broome, O.C. (1980.): Blueberry micropropagation, 44-47.

Zimmerman, R.H. (1987.): Micropropagation of woody plants: Post tissue culture aspects, Acta Hort., 227:489-499.

Ziv, M. (1991a.): Quality of micropropagated plants – vitrification, In Vitro Cell. Dev. Biol., 27:64-69.

Ziv, M. (1991b.): Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants, Pages 45-69 in P. C. Debergh and R.H. Zimmerman, eds. Micropropagation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Ziv, M., Chen, J., Vishnevetsky, J. (2003.): Propagation of plants in bioreactors: prospects and limitations, Acta Hortic., 616:85-93.

Wolfe, D.E., Eck, P., Chin, C. (1983.): Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry, HortScience, 18:703-705.

### **Internetski izvori:**

[https://www.dzs.hr/Hrv\\_Eng/publication/2019/01-01-28\\_01\\_2019.htm](https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2019/01-01-28_01_2019.htm)

<https://www.hgk.hr/documents/poljoprivreda-i-prehrambena-industrija-obz5dd68ea65b3ec.pdf>

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

<https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg230.pdf>



## 8. SAŽETAK

Moderna rasadničarska praksa razvijenih članica Europske unije u proizvodnji sadnog materijala, temelji se dijelom ili u potpunosti na uporabi suvremenih biotehnoloških metoda (mikropropagacija, kultura tkiva *in vitro*). Imerzni sustav bioreaktora (TIB/TIS) koristi tekući hranjivi medij kojeg je moguće mijenjati u svakom trenutku. Istraživanje o mogućnosti mikropropagacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u tekućem imerznom sustavu provedeno je na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* laboratorij za voćarstvo). Ispitivan je utjecaja određenih koncentracija citokinina zeatina (0,5, 1, 2 i 2\* ml/l) na uspješnost mikropropagacije dva kultivara borovnice Duke i Legacy. Utvrđena je značajna varijabilnost između kultivara u odgovoru na primijenjene tretmane. Kod kultivara Duke tretman s 0,5 ml/l zeatina rezultirao je značajno većim izdancima, multiplikacijom i brojem listova. Manje koncentracije zeatina od 0,5 i 1 ml/l rezultirale su boljim morfološkim parametrima kod kultivara Legacy. Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti na ispitivanja učinka različitih frekvencija imerzije i ventilacije tijekom mikropropagacije borovnice u tekućem imerznom sustavu. Detaljnije pristupiti utvrđivanju djelotvornosti zeatina kroz analizu medija da bi se utvrdila postojanost koncentracije nakon autoklaviranja.

**Ključne riječi:** borovnica, mikropropagacija, zeatin, bioreaktor, TIS

## 9. SUMMARY

Modern fruit nursery practice of developed member states of the European Union in the production of planting material is based in part or in full use of modern biotechnological methods (micropropagation, tissue culture *in vitro*). Temporary Immersion System (TIB/TIS) uses a liquid nutrient medium that can be changed at any time. Study on the possibility of micropropagation blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) in liquid immersion system was conducted at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Department of Pomology, Viticulture and Enology (*in vitro* pomology laboratory). The influence of certain concentrations of cytokinin zeatin (0.5, 1, 2, 2\* ml/l) was examined in micropropagation of two blueberry cultivars Duke and Legacy. Significant variability between cultivars in response to applied treatments was found. Duke cultivar on treatment with 0.5 ml/l zeatin resulted in significantly greater shoots, multiplication and number of leaves. Lower zeatin concentrations of 0.5 and 1 ml/l resulted in better morphological parameters in Legacy cultivars. Further research should be focus on investigating the effect of different frequencies of immersion and ventilation during blueberry micropropagation in a liquid immersion system. A more detailed approach to determining the efficacy of zeatin through media analysis to determine the stability of the concentration after autoclaving.

**Key words:** Blueberry, Micropropagation, Zeatin, Bioreactor, TIS

## 10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Tretmani u istraživanju.....	20
Tablica 2. Razlike na razini cijelog pokusa između kultivara (Duke i Legacy), tretmana (koncentracija zeatina ml/l: 0.5, 1, 2 i 2* autoklavirano) te interakcija kultivar x tretman za promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	28
Tablica 3. Razlike između kultivara (Duke i Legacy) po tretmanima zeatinom (0.5, 1, 2 i 2* ml/l) na promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	29
Tablica 4. Razlike u učinkovitost između tretmana zeatinom (0.5, 1, 2 i 2* ml/l) po kultivarima (Duke i Legacy) na promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	30

## 11. POPIS SLIKA

Slika 1. Top 10 proizvođača borovnice u svijetu.....	3
Slika 2. Kretanje svjetske proizvodnje borovnice 1961. – 2018.....	4
Slika 3. Grm borovnice.....	5
Slika 4. Korijenov sustav borovnice.....	6
Slika 5. Listovi borovnice.....	7
Slika 6. Cvat borovnice.....	8
Slika 7. Sazrijevanje bobica borovnice – faze.....	10
Slika 8. Stadij sazrijevanja borovnice.....	11
Slika 9. TIB sustav bioreaktora SETIS.....	16
Slika 10. Imerzni sustav bioreaktora SETIS, FAZOS.....	17
Slika 11. Izvor eksplantata, lijevo – Duke, desno – Legacy, FAZOS.....	18
Slika 12. Sastav hranjive podloge WPM.....	19
Slika 13. Disekcija i bioreaktori s eksplantatima – tretmani, FAZOS.....	21
Slika 14. Princip rada SETIS imerznog sustava bioreaktora.....	22
Slika 15. Bioreaktori u klima komori, FAZOS.....	22
Slika 16. Mjerenje morfoloških parametara, FAZOS.....	23
Slika 17. Kultivar Duke pri tretmanima: A – 0,5 ml/l, B – 1 ml/l, C - 2 ml/l, D - 2* ml/l, FAZOS.....	25
Slika 18. Kultivar Legacy pri tretmanima: A - 0,5 ml/l, B – 1 ml/l, C - 2 ml/l, D - 2* ml/l, FAZOS.....	27
Slika 19. Najučinkovitiji tretmani: A – Legacy 1 ml/l i B – Duke 0,5 ml/l zeatina, FAZOS.....	31

## **12. POPIS GRAFIKONA**

Grafikon 1. Razlike između tretmana za kultivar Duke.....24

Grafikon 2. Razlike između tretmana za kultivar Legacy.....26

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek  
Sveučilišni diplomski studij, smjer Voćarstvo

Diplomski rad

## MIKROPROPAGACIJA BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.)

### U TEKUĆEM IMERZNOM SUSTAVU

Josip Lukšić

**Sažetak:** Moderna rasadničarska praksa razvijenih članica Europske unije u proizvodnji sadnog materijala, temelji se dijelom ili u potpunosti na uporabi suvremenih biotehnoloških metoda (mikropropagacija, kultura tkiva *in vitro*). Imerzni sustav bioreaktora (TIB/TIS) koristi tekući hranjivi medij kojeg je moguće mijenjati u svakom trenutku. Istraživanje o mogućnosti mikropropagacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u tekućem imerznom sustavu provedeno je na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* laboratorij za voćarstvo). Ispitivan je utjecaja određenih koncentracija citokinina zeatina (0.5, 1, 2 i 2\* ml/l) na uspješnost mikropropagacije dva kultivara borovnice Duke i Legacy. Utvrđena je značajna varijabilnost između kultivara u odgovoru na primijenjene tretmane. Kod kultivara Duke tretman s 0.5 ml/l zeatina rezultirao je značajno većim izdancima, multiplikacijom i brojem listova. Manje koncentracije zeatina od 0.5 i 1 ml/l rezultirale su boljim morfološkim parametrima kod kultivara Legacy. Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti na ispitivanja učinka različitih frekvencija imerzije i ventilacije tijekom mikropropagacije borovnice u tekućem imerznom sustavu. Detaljnije pristupiti utvrđivanju djelotvornosti zeatina kroz analizu medija da bi se utvrdila postojanost koncentracije nakon autoklaviranja.

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijeku

**Mentor:** prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević

**Broj stranica:** 41

**Broj grafikona i slika:** 21

**Broj tablica:** 4

**Broj literaturnih navoda:** 47

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** borovnica, mikropropagacija, zeatin, bioreaktor, TIS

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

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

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

# **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek**  
**University graduate study, course Pomology**

**Graduate work**

## **MICROPROPAGATION OF BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum* L.) IN LIQUID IMMERSION SYSTEM**

Josip Lukšić

**Abstract:** Modern fruit nursery practice of developed member states of the European Union in the production of planting material is based in part or in full use of modern biotechnological methods (micropropagation, tissue culture *in vitro*). Temporary Immersion System (TIB/TIS) uses a liquid nutrient medium that can be changed at any time. Study on the possibility of micropropagation blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) in liquid immersion system was conducted at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Department of Pomology, Viticulture and Enology (*in vitro* pomology laboratory). The influence of certain concentrations of cyatokinin zeatin (0.5, 1, 2 and 2\* ml/l) was examined in micropropagation of two blueberry cultivars Duke and Legacy. Significant variability between cultivars in response to applied treatments was found. Duke cultivar on treatment with 0.5 ml/l zeatin resulted in significantly greater shoots, multiplication and number of leaves. Lower zeatin concentrations of 0.5 and 1 ml/l resulted in better morphological parameters in Legacy cultivars. Further research should be focus on investigating the effect of different frequencies of immersion and ventilation during blueberry micropropagation in a liquid immersion system. A more detailed approach to determining the efficacy of zeatin through media analysis to determine the stability of the concentration after autoclaving.

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

**Mentor:** Aleksandar Stanisavljević, Ph.D., full.prof.

**Number of pages:** 41

**Number of figures and pictures:** 21

**Number of tables:** 4

**Number of references:** 47

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** Blueberry, Micropropagation, Zeatin, Bioreactor, TIS

### **Reviewers:**

1. Dejan Bošnjak, MSc, president
2. Aleksandar Stanisavljević, Ph.D., full.prof., mentor
3. Monika Tkalec Kojić, Ph.D., member

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.