

Optimizacija mikropropagacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) primjenom nanobiotehnologije u tekućem imerznom (TIB/TIS) sustavu bioreaktora

Bošnjak, Dejan

Doctoral thesis / Disertacija

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:584311>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



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](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dejan Bošnjak, mag. ing. agr.

**OPTIMIZACIJA MIKROPROPAGACIJE BOROVNICE
(*Vaccinium corymbosum* L.) PRIMJENOM NANOBIOTEHNOLOGIJE
U TEKUĆEM IMERZNOM (TIB/TIS) SUSTAVU BIOREAKTORA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2022.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dejan Bošnjak, mag. ing. agr.

**OPTIMIZACIJA MIKROPROPAGACIJE BOROVNICE
(*Vaccinium corymbosum* L.) PRIMJENOM NANOBIOTEHNOLOGIJE
U TEKUĆEM IMERZNOM (TIB/TIS) SUSTAVU BIOREAKTORA**

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2022.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dejan Bošnjak, mag. ing. agr.

**OPTIMIZACIJA MIKROPROPAGACIJE BOROVNICE
(*Vaccinium corymbosum* L.) PRIMJENOM NANOBIOTEHNOLOGIJE
U TEKUĆEM IMERZNOM (TIB/TIS) SUSTAVU BIOREAKTORA**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Aleksandar Stanisavljević
Komentor: izv. prof. dr. sc. Dubravka Špoljarić Maronić

Povjerenstvo za ocjenu:

- 1. izv. prof. dr. sc. Tomislav Vinković, izvanredni profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednik**
- 2. izv. prof. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, izvanredna profesorica Odjela za biologiju u Osijeku, član**
- 3. doc. dr. sc. Monika Tkalec Kojić, docentica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, član**

Osijek, 2022.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dejan Bošnjak, mag. ing. agr.

**OPTIMIZACIJA MIKROPROPAGACIJE BOROVNICE
(*Vaccinium corymbosum* L.) PRIMJENOM NANOBIOTEHNOLOGIJE
U TEKUĆEM IMERZNOM (TIB/TIS) SUSTAVU BIOREAKTORA**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Aleksandar Stanisavljević

Komentor: izv. prof. dr. sc. Dubravka Špoljarić Maronić

**Javna obrana doktorske disertacije održana je 23. rujna 2022. godine pred
Povjerenstvom za obranu:**

- 1. izv. prof. dr. sc. Tomislav Vinković, izvanredni profesor Fakulteta
agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednik**
- 2. izv. prof. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, izvanredna profesorica Odjela za
biologiju u Osijeku, član**
- 3. doc. dr. sc. Monika Tkalec Kojić, docentica Fakulteta agrrobiotehničkih znanosti
Osijek, član**

Osijek, 2022.

Najiskreniju zahvalu dugujem svojem dragom profesoru i mentoru prof. dr. sc. Aleksandru Stanisavljeviću na ukazanom povjerenju te svesrdnoj i nesebičnoj pomoći i podršci tijekom mog znanstveno istraživačkog rada. Hvala Vam na bezuvjetnom prijateljstvu, podršci, prenesenom znanju te pomoći kada mi je bila najpotrebnija.

Također, veliku zahvalu dugujem komentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Špoljarić Maronić i izv. prof. dr. sc. Ivni Štolfi Čamagajevac s Odjela za biologiju na pomoći u laboratorijskim analizama, konstruktivnim savjetima te nesebičnom odvajanju svoga vremena kada god je to bilo potrebno. Veliko hvala i dragim kolegicama s Odjela za biologiju Nikolini, Lidiji, Selmi, Ani i svim ostalima koji su bili uključeni u pripremu i provođenje fiziološko-biokemijskih te histoloških analiza.

Zahvaljujem i mom dragom kolegi izv. prof. dr. sc. Tomislavu Vinkoviću na razumijevanju, prijateljstvu i ustupljenoj znanstvenoj laboratorijskoj opremi za provedbu i realizaciju istraživanja, te na svim savjetima i sugestijama od samog početka rada na Fakultetu.

Zahvalu upućujem i svim mojim kolegama s Fakulteta na podršci i konstruktivnim sugestijama koje su doprinijele unaprjeđenju ove disertacije. Veliko hvala Ankici Sladović Pranjić, Moniki, Mariji, Andrijani, Dejanu, Miri, Borisu, Mati, Toniju, Željku, Žarku, Darku i cijelom timu Centralnog laboratorija Zavoda za agroekologiju i zaštitu okoliša. Svima se vama i onima koje nisam spomenuo, a doprinijeli su ovoj disertaciji, od srca zahvaljujem, iznimno poštujući vaš doprinos,
Hvala Vam!

Posebno hvala mojoj Mirni i Patriku, sestri Sanji, šogoru Zoranu i nećaku Franu te na kraju mojim roditeljima Stipi i Ani na bezuvjetnoj podršci, ljubavi, svim odricanjima, razumijevanju i trudu koji su nesebično uložili u moje školovanje – ovo je za vas.

Dejan Bošnjak

Istraživanje je provedeno u sklopu dijela istraživačkog projekta NutriNTENSE (IP-2018-01-8119) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ)

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti
Smjer: Agrokemija

UDK: 634.73+631.52:620.3

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

Grana: Bilinogojstvo

Optimizacija mikropropagacije borovnice (*Vaccinium corymbosum L.*) primjenom nanobiotehnologije u tekućem imerznom (TIB/TIS) sustavu bioreaktora

Dejan Bošnjak, mag. ing. agr.

Disertacija je izrađena na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: prof. dr. sc. Aleksandar Stanisavljević

Komentor: izv. prof. dr. sc. Dubravka Špoljarić Maronić

Imerzni sustav bioreaktora predstavlja potpuno kontrolirani modularni biotehnološki sustav koji koristi tekuću hranjivu podlogu, bez dodatka agara. Jedan od postojećih problema uzgoja biljaka u ovakvim sustavima je pojava vitrifikacije ili hiperhidriranosti. Vitrifikacija se u kulturi tkiva vizualno manifestira brojnim morfološkim poremećajima kao što su razvoj transparentnih listova, nabubrenih stabljika i deformiranih izdanaka koji postaju lomljivi ili nekrotični. Doktorska disertacija temelji se na istraživanju optimizacije uzgojnih uvjeta u mikropropagaciji borovnice (*Vaccinium corymbosum L.*) u TIB/TIS sustavu (SETIS™) s ciljem smanjenja štetne vitrifikacije primjenom nanočestica SiO₂ i ZnO te biljnog regulatora floroglucinola. Istraživanje je provedeno na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek tijekom 2020. i 2021. godine. Tekući medij sadržavao je mikro- i makroelemente WPM hranjive podloge (pH 5,0) uz dodatak 30 g/L šećera, 2 mg/L zeatina i 2 ml/L PPM-a. Istraživanje je uključivalo kontrolnu varijantu, četiri tretmana s primjenom nanočestica silicija (30 i 74 mg/L nano-SiO₂) i cinka (1 i 10 mg/L nano-ZnO), dva tretmana biljnim regulatorom floroglucinolom (40 i 80 mg/L) te četiri tretmana kombinacije pojedinih nanočestica s floroglucinolom. Po završetku kultivacijskoga perioda (40 dana) utvrđen je značajni utjecaj tretmana na indeks vitrifikacije, anatomske značajke lista, morfološke pokazatelje rasta i razvoja, stabilnost hranjivog medija, bioakumulaciju elemenata mineralne ishrane te fiziološko-biokemijski odgovor biljaka borovnice. Indeks vitrifikacije kretao se od 10 do 40 %. Kontrolni tretman rezultirao je vitrifikacijom od 40 %. Analizom vitrificiranog biljnog materijala utvrđeno je veliko odstupanje od pravilnog rasporeda i građe staničja mezofila lista. Značajno veći broj puči zabilježen je kod tretmana floroglucinolom, ali i kod tretmana njegove kombinacije s nano-SiO₂ i nano-ZnO. Tretmani nano-SiO₂ značajno su reducirali broj puči. Analizirani morfometrijski parametri i parametri produktivnosti nakon tretmana nano-SiO₂ te kombinacije s floroglucinolom nisu se značajno razlikovali u odnosu na kontrolni tretman. Nasuprot tome, tretmani nano-ZnO smanjili su vrijednosti morfometrijskih parametara te multiplikaciju, osim kombinacije floroglucinola s nano-ZnO gdje su utvrđeni značajno veći izdanci. Smanjenje koncentracija elemenata biljne ishrane pratilo je dinamiku usvajanja elemenata u biljnom tkivu eksplantata. Bioakumulacija Zn i Si u biljnom tkivu u odnosu na kontrolni tretman bila je u pozitivnoj korelaciji s vrijednostima nano-SiO₂ i nano-ZnO primijenjenim kroz zadane tretmane neovisno o koncentraciji. Primjena nano-SiO₂ kao i nižih koncentracija floroglucinola nije utjecala na povećanje sadržaja ukupnog klorofila i karotenoida. Nasuprot tome, tretmani nano-ZnO i floroglucinolom, kao i tretmani kombinacije nano-SiO₂ i nano-ZnO s floroglucinolom, rezultirali su smanjenjem sadržaja ukupnog klorofila i karotenoida. Primjena nano-SiO₂ nije imala stresan učinak na pokazatelje fiziološko-biokemijskog odgovora kao što su sadržaj ukupnog klorofila i karotenoida, ukupnih fenola, sadržaj askorbinske kiseline i ukupne antioksidacijske aktivnosti. Također je kod navedenih tretmana utvrđena niska stopa vitrifikacije (20 %) te pravilne proporcije morfometrijskih parametara s parametrima produktivnosti u razini kontrole. Floroglucinol u nižoj koncentraciji od 40 mg/L također nije utjecao na promjenu sadržaja produkata lipidne peroksidacije. Sadržaj ukupnog klorofila i karotenoida, ukupnih fenola, antioksidativna aktivnost te sadržaj askorbinske kiseline bili su u razini kontrolnog tretmana, uz pozitivni učinak na pojedine morfometrijske parametre, produktivnost te indeks vitrifikacije. Rezultati istraživanja upućuju na potencijal primjene nanočestica SiO₂, ali i biljnog regulatora floroglucinola, u supresiji vitrifikacije izdanka borovnice pri uzgojnim

uvjetima TIB/TIS bioreaktora na tekućem hranjivom mediju. Usavršavanje protokola ukazuje na potrebu određivanja preciznijih koncentracija, ali i oblika Si, odnosno floroglucinola kao modela opcijskog reagensa u naknadnoj subkultivacijskoj fazi.

Broj stranica: 161

Broj slika i grafikona: 49

Broj tablica: 30

Broj literaturnih navoda: 371

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: TIB/TIS sustav, borovnica, vitrifikacija/hiperhidriranost, nanočestice, floroglucinol

Datum obrane: 23. rujna 2022.

Povjerenstvo za obranu:

1. **izv. prof. dr. sc. Tomislav Vinković** – predsjednik
2. **izv. prof. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac** – član
3. **doc. dr. sc. Monika Tkalec Kojić** – član

Disertacija je pohranjena u: Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Rijeci, Sveučilište u Splitu

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

PhD thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Postgraduate university study: Agricultural sciences
Course: Agrochemistry

UDK: 634.73+631.52:620.3
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Agriculture
Branch: Plant production

The Optimization of Blueberry Micropropagation (*Vaccinium corymbosum* L.) Using Nanobiotechnology in Liquid Immersion (TIB/TIS) Bioreactor System

Dejan Bošnjak, M. Eng. Sc., Agriculture

Thesis performed at Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Supervisor: PhD Aleksandar Stanisavljević, full professor
Co-Supervisor: PhD Dubravka Špoljarić Maronić, associate professor

A temporary Immersion Bioreactor System (TIB/TIS) is a fully controlled, modular biotechnical system that uses a liquid nutrient medium without agar addition. One of this system's existing problems, however, is the emergence of vitrification (hyperhydricity), which is visually manifested in the form of plants' morphological disorders, transparent leaf development, and swollen stems and shoots, which are deformed and become brittle. The dissertation is based on research of growing condition optimization in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) micropropagation by a TIB/TIS system (SETIS™), with the aim of reducing harmful vitrification when applying SiO₂ and ZnO nanoparticles and phloroglucinol as a plant growth regulator. The experiment was conducted at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek during the years 2020 and 2021. The liquid nutrient medium contained the micro- and macroelements of the WPM medium (pH 5.0), with the addition of 30 g/L of sugar, 2 mg/L of zeatin, and 2 ml/L of PPM. The experiment included a control variant, four treatments using different nanoparticles (30 and 74 mg/L of nano-SiO₂ and 1 and 10 mg/L of nano-ZnO, respectively), two plant growth regulator (40 and 80 mg/L of phloroglucinol) treatment, and four treatments using individual nanoparticle combinations with the plant growth regulator. At the end of the cultivation period (40 days), a significant effect of the treatment was determined on the vitrification index, leaf anatomy, morphological parameters, nutrient medium stability, mineral nutrition elements' bioaccumulation, and blueberry plants' physiological-biochemical response. The vitrification index was within the range of 10 % to 40 %. The control treatment resulted in forty-percent vitrification. By analyzing the vitrified plant material (40 %), a large deviation from a proper arrangement and structure of the leaf mesophyll cells was detected. Thus, a significantly larger stomata number was detected in the phloroglucinol treatment, as well as in the treatment of its combination with nano-SiO₂ and nano-ZnO. Nano-SiO₂ treatments significantly reduced the stomata number. By analyzing the morphometric and productivity parameters, nano-SiO₂ treatments, and a combination with phloroglucinol, the values of a control treatment were obtained. In contrast, the nano-ZnO treatments reduced the values of morphometric parameters and multiplication, except in the case of phloroglucinol treatment with nano-ZnO, which resultn the significantly higher shoots. The decreasing concentrations of plant nutrition elements followed the element adoption dynamics within the explant plant tissue. In relation to the control treatment, the bioaccumulation of zinc (Zn) and silicon (Si) in the plant tissue is positively correlated to the values of nano-SiO₂ and nano-ZnO, applied through the given treatments regardless of concentrations. The application of nano-SiO₂, as well as the lower phloroglucinol levels, did not affect an increase in the total chlorophyll and carotenoid content. In contrast, the treatments of nano-ZnO, phloroglucinol, and the combination of nano-SiO₂ and nano-ZnO with phloroglucinol resulted in a decrease in total chlorophyll and carotenoid content. A physiological-biochemical response to the application of nano-SiO₂ did not exert a stressful effect on the plants, and simultaneously the content of total chlorophyll and carotenoids, total phenols, and antioxidant activity and ascorbic acid did not change. Likewise, in the mentioned treatments, a low vitrification rate (20 %) and the correct morphometric and productivity proportions were established on the control level. Also, phloroglucinol, in a lower concentration of 40 mg/L, did not affect on the change of lipid peroxidation products content. The content of total chlorophyll and carotenoids, total phenols, antioxidant

activity, and ascorbic acid are at the level of control treatment, with a positive effect exerted on certain morphometric parameters, productivity, and vitrification index. The research results indicate a potential of using SiO₂ nanoparticles, as well as the phloroglucinol plant regulator, in suppressing the blueberry shoots' vitrification in the TIB/TIS bioreactor under the growing conditions on a liquid nutrient medium. A protocol improvement imposes a necessity to determine the more precise concentrations and silicon forms and to determine phloroglucinol as an optional reagent model in a subsequent sub-cultivation phase.

Number of pages: 161

Number of figures: 49

Number of tables: 30

Number of references: 371

Original in: Croatian

Keywords: TIB/TIS system, blueberry, vitrification/hyperhydricity, nanoparticles, phloroglucinol

Date of the thesis defense: September 23, 2022.

Reviewers:

1. **PhD Tomislav Vinković, associate professor – chair**
2. **PhD Ivna Štolfa Čamagajevac, associate professor – member**
3. **PhD Monika Tkalec Kojić, assistant professor – member**

Thesis deposited in: National and University Library, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, University of Zagreb; University of Rijeka; University of Split

KAZALO

1. UVOD	1
1.1. Pregled literature.....	4
1.1.1. Konvencionalni model mikropropagacije biljnog tkiva <i>in vitro</i> na polučvrstom mediju.....	4
1.1.2. Suvremeni imerzni (TIB/TIS) sustav bioreaktora s tekućim hranjivim medijem...5	
1.1.3. Hiperhidriranost ili vitrifikacija u imerznom (TIB/TIS) sustavu bioreaktora i mogućnosti njene kontrole.....	8
1.1.4. Nanotehnologija u kulturi biljnog tkiva <i>in vitro</i> - primjena nano-SiO ₂ , nano-ZnO i biljnog regulatora floriglucina.....	12
1.2. Cilj istraživanja.....	25
2. MATERIJAL I METODE RADA	26
2.1. Postavljanje istraživanja.....	26
2.2. SETIS™ imerzni sustav bioreaktora.....	29
2.3. Tretmani primijenjeni u istraživanju.....	30
2.4. Uzorkovanje tekućeg hranjivog medija, biljnog materijala i priprema za analize.....	32
2.5. Vizualna opažanja i indeks vitrifikacije.....	32
2.6. Mjerenje rasta i razvoja – biljni morfološki pokazatelji.....	33
2.7. Analiza anatomije listova.....	35
2.8. Analiza mineralnog sastava medija i biljnog tkiva borovnice.....	36
2.9. Mjerenje pH i EC vrijednosti tekućeg hranjivog medija.....	37
2.10. Analize fiziološko-biokemijskih pokazatelja reakcije biljaka na primijenjene tretmane i uzgojne uvjete.....	37
2.11. Statistička obrada podataka.....	40
3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	41
3.1. Vizualna opažanja i indeks vitrifikacije.....	41

3.2. Morfološki pokazatelji rasta i razvoja.....	49
3.3. Anatomske značajke lista.....	52
3.4. Mineralni sastav tekućeg hranjivog medija i biljnog materijala.....	55
3.5. pH i EC vrijednosti tekućeg hranjivog medija.....	82
3.6. Fiziološko-biokemijski pokazatelji reakcije biljaka borovnice na primijenjene tretmane.....	84
3.7. Korelacije između ispitivanih svojstava na biljkama borovnice.....	87
4. RASPRAVA.....	95
4.1. Intenzitet vitifikacije izdanaka i anatomske značajke listova borovnice u TIB/TIS sustavu.....	95
4.2. Rast i razvoj (produktivnost) izdanaka borovnice u TIB/TIS sustavu.....	100
4.3. Stabilnost hranjivog medija i bioakumulacija elemenata mineralne ishrane u izdancima borovnice.....	103
4.4. Fiziološko-biokemijski odgovor biljaka borovnice u TIB/TIS sustavu.....	109
4.5. Evaluacija primjene nanočestica SiO ₂ , ZnO i biljnog regulatora floriglucina u evoluciji protokola za mikropropagaciju borovnice na tekućem hranjivom mediju (TIB/TIS sustav).....	117
5. ZAKLJUČCI.....	122
6. LITERATURA.....	125
7. SAŽETAK.....	158
8. SUMMARY.....	160

1. UVOD

Biljna biotehnologija jedna je od najvažnijih znanstveno-tehnoloških dostignuća ovog stoljeća te ima izuzetnu ulogu u razvoju suvremene poljoprivrede i hortikulture. Mikropropagacija biljaka *in vitro* predstavlja vrlo važnu granu biljne biotehnologije. Masovnost proizvodnje fitosanitarno ispravnog te visokokvalitetnog reproduktivnog biljnog materijala u brzom ciklusu, osigurana je upravo upotrebom tehnologije mikropropagacije *in vitro* u aseptičnim uvjetima. U svijetu je još uvijek najzastupljeniji konvencionalni model *in vitro* mikropropagacije biljnog materijala na čvrstom i polučvrstom mediju.

Na globalnom tržištu svježe hrane, odnosno voća, borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) sa svojom izraženom nutri-farmaceutskom vrijednošću zauzima sve važnije mjesto. Svjetskim tržištem dominira SAD, Kanada i Peru, koji trenutno drže više od 80% svjetske proizvodnje. Kao intenzivna kultura u RH nema veliku tradiciju, a intenziviranje njenog uzgoja započinje tek u zadnjem desetljeću. Pored prisutnog problema introdukcije ove nove voćne vrste te nepoznavanja tehnologije proizvodnje, ograničavajući faktor njenog širenja u Hrvatskoj predstavlja vrlo mali areal pogodnih lokaliteta s adekvatnim agroekološkim uvjetima. Trenutna masovna ekspanzija rasta proizvodnih površina uz medijsko eksponiranje podiže svijest potrošača o nutritivnoj vrijednosti borovnice. Danas, borovnica je predstavljena kao funkcionalna hrana, odnosno „supervoće“ s vrlo povoljnim učinkom na ljudsko zdravlje.

Potreba korporativnog rasta, povećanja učinkovitosti i automatizacije, odnosno globalne masovnosti proizvodnje i opskrbe nameće uporabu imerznih TIB/TIS sustav bioreaktora nove generacije (TIB, eng. *Temporary Immersion Bioreactor*; TIS, eng. *Temporary Immersion System*) kao neophodno tehnološko rješenje u suvremenoj biotehnologiji.

Moderna znanstveno istraživačka praksa razvijenih članica Europske unije naslanja se na upotrebu suvremene biotehnologije (mikropropagacija, kultura tkiva *in vitro*). Reprodukcijski biljaka *in vitro* (kultura tkiva, mikropropagacija) predstavlja suvremeni biotehnološki proces masovne proizvodnje genetski identičnih, fiziološki uniformnih i

zdravih biljaka. Prednosti se očituju kroz smanjenje potreba za manipulativnim prostorom, kratkim vremenskim intervalom proizvodnje, manjom količinom inicijalnog baznog početnog biljnog materijala, dugog čuvanja klonskog biljnog materijala, prenošenja, itd. Konvencionalni model mikropropagacije biljnog materijala *in vitro* ograničen je uporabom agara (zgušnjivač za čvrsti ili polučvrsti hranjivi medij = gel) koji ujedno i poskupljuje samu proizvodnju za razliku od suvremenog imerznog sustava bioreaktora (TIB/TIS).

Ovaj potpuno kontrolirani modularni biotehnološki TIB/TIS sustav koristi tekuću hranjivu podlogu koja isključuje upotrebu agara. Pristup tekućem hranjivom mediju u cilju modifikacije mineralne ishrane ili mijenjanja uvjeta mikroatmosfera u bioreaktoru tijekom svih faza mikropropagacije moguć je u svakom trenutku. Sustav se odlikuje visokom učinkovitošću i skraćenim ciklusom proizvodnje (brži rast biljnih kultura), širokim rasponom u proizvodnji mnogih biljnih vrsta, sekundarnih metabolita, biomase, a sam sustav je potpuno automatiziran te vrlo brz i efikasan. Također, povećana je stopa multiplikacije (umnožavanja) i preživljavanja, smanjeni su troškovi pripreme medija te ušteda na energentima, radnoj snazi i laboratorijskom prostoru. Uslijed konstrukcijskih rješenja olakšana je manipulacija s biljnim materijalom koja rezultira lakšom i jednostavnijom masovnom proizvodnjom.

Međutim, potrebno je razviti precizne protokole za uzgoj biljaka kako bi se postigla maksimalna učinkovitost i produktivnost, te kvaliteta proizvedenog biljnog materijala. Učinkovitost mikropropagacije borovnice uporabom suvremenog TIB/TIS sustava (tekući medij) uvelike ovisi i o primijenjenim koncentracijama te vrsti regulatora rasta i hraniva, genotipu, staničnoj osjetljivosti, a napose pravilnoj i uspješnoj fazi rizogeneze i aklimatizacije.

Mnogi istraživači navode teškoće koje su prisutne kako u konvencionalnom modelu (čvrsti i polučvrsti hranjivi medij), tako i u sustavu s tekućim medijem. Jedan od najvećih problema pri standardizaciji, odnosno pronalaženju pravih protokola uzgoja je pojava stresa koji se javlja u tkivima uslijed štetne vitrifikacije (hiperhidriranosti) biljnog materijala. Vitrifikacija ili hiperhidriranost (eng. *hyperhydricity*) u kulturi tkiva vizualno se manifestira u obliku morfoloških promjena na biljkama, razvojem transparentnih (prozirnih, vodenastih) listova, nabubrenih stabljika i izdanaka koji se deformiraju i postanu izrazito lomljivi

(staklasti). Iznese su brojne hipoteze koje objašnjavaju vitrifikaciju, ali još uvijek nema prave spoznaje o prirodi signala odgovornog za vitrifikaciju i razne biokemijske, metaboličke i fiziološke procese koji sudjeluju u njenom nastanku. Stresni pokazatelji koji se pojavljuju pri vitrifikaciji nisu u potpunosti vizualno izraženi stoga i utvrđivanje vitrifikacije do kraja uzgojnog ciklusa predstavlja problem.

Novije studije navode da se abnormalna morfološka stanja izazvana vitrifikacijom mogu pripisati promjenama koje se javljaju na staničnoj razini uslijed modifikacije membranskog sustava ili sadržaja DNA. Najčešće metode kontrole ili sprječavanja vitrifikacije su: kontrola i modifikacija mikroatmosfere, prilagodba hranjivih podloga kroz povećanje ili smanjenje pojedinih komponenti medija (hraniva, hormoni, agar) uz dodavanje pojedinih suplemenata ili rijetkih elemenata (antivitrifikacijske supstance). Kontrolom mikroatmosfere, odnosno uporabom bioreaktora nove generacije (imerzni sustavi) moguće je reducirati vrijeme potapanja biljnog materijala u hranjivi medij, povećati ventilaciju i izmjenu plinova te obogatiti mikroatmosferu korisnim plinovima u bioreaktoru s biljkama (komora za rast).

Proizvodnja borovnice je uslijed velike potražnje posljednjih godina u brzom porastu. Slijedom navedenog, od velike je važnosti proizvodnja homogenog biljnog materijala, čistog od biljnih patogena u kratkom vremenskom intervalu. Zahvaljujući trudu mnogih znanstvenika posljednjih je godina tehnika mikropropagacije biljaka *in vitro* dosta pojednostavljena te postoje brojni protokoli i tehnike mikropropagacije koji se danas rutinski izvode u većini laboratorija. Iako je konvencionalna mikropropagacija određenih biljnih vrsta ograničena i proizvodnja nije uvijek jednostavna, njena primjena u hortikulturi, poljoprivredi i šumarstvu sve se više širi na globalnoj razini.

Podizanje razine tehnoloških procesa uvođenjem navedene tehnologije u znanstveno istraživačku praksu naše zemlje nameće se kao imperativ koji je potrebno ostvariti u znanstveno istraživačkom radu. Podatci dobiveni u ovom istraživanju imaju veliki značaj u primjeni nanotehnologije u mikropropagaciji borovnice putem imerznih bioreaktora. Dobiveni rezultati predstavljaju temelj za sva daljnja istraživanja u ovom području, budući da posljedice uvođenja određenih vrsta nanomaterijala u proces mikropropagacije kao i njihov utjecaj na rast i razvoj biljaka *in vitro* nisu dovoljno istraženi.

1.1. Pregled literature

1.1.1. *Konvencionalni model mikropropagacije biljnog tkiva in vitro na polučvrstom mediju*

Proizvodnja borovnice je posljednjih godina uslijed velike potražnje u rapidnom porastu te je brza i masovna proizvodnja uniformnog biljnog materijala, očišćenog od biljnih patogena vrlo važna (**Hongyang i sur., 2017.**). Zahvaljujući mnogim znanstveno-istraživačkim radovima posljednjih je godina tehnika mikropropagacije biljaka *in vitro* dosta pojednostavljena. Iz dosadašnjih istraživanja proizašli su brojni protokoli i tehnike mikropropagacije koje se danas rutinski izvode u laboratorijima diljem svijeta. Iako je konvencionalni model mikropropagacije određenih biljnih vrsta ograničen i proizvodnja nije uvijek jednostavna, njena primjena u hortikulturi, poljoprivredi i šumarstvu sve se više širi na globalnoj svjetskoj razini (**Terwase i sur., 2012.**).

Rana istraživanja o kulturi biljnog tkiva i organa započela su tek u XIX. stoljeću kada je nekolicina botaničara počela s kultivacijom (uzgojem) biljnih embrija i biljnog tkiva (**Tieghen, 1878.; Hanning, 1904.; Andronescu, 1917.**). Ideja o mikropropagaciji biljnog tkiva proizašla je iz činjenice o staničnoj totipotenciji koja govori da su mnoge biljne stanice sposobne stvoriti bilo koji drugi tip stanica ili tkiva koji su potrebni za regeneraciju cijele biljke. **Haberlandt (1902.)** je osmislio koncept kulture tkiva i postavio temelj u kultivaciji biljnih stanica, tkiva i organa. Kultura tkiva može se definirati kao kultura svih vrsta biljnih stanica, tkiva i organa u aseptičnim (sterilnim) uvjetima. Kultura tkiva omogućava i klonско размноžavanje sadnog materijala te njegovu lakšu distribuciju u cilju podizanja intenzivnih trajnih nasada. Na ovaj je način moguće proizvesti tisuće kopija biljaka (klonova) u kratkom vremenskom roku. *In vitro* model kulture tkiva obuhvaća širok raspon tehnika i tehnologija među kojima su i somatska embriogeneza, somatska hibridizacija, eliminacija virusa te primjena različitih izvedbi bioreaktora s tekućim medijem (**González i sur., 2011.; Martínez i sur., 2016.**). Općenito, u svim tehnikama kulture tkiva *in vitro* manipuliramo stanicama, anterama prašnika, peludnim zrcima, dijelovima korijena, sjemenom, pupovima, nodijalnim segmentima s aksilarnim pupom, meristemom, kalusom ili drugim tkivima u aseptičnim uvjetima. Razne tvrtke i institucije diljem svijeta uložile su ili se specijalizirale za ove aktivnosti kako bih osigurale uzgajivačima i proizvođačima visoko

kvalitetan i zdrav sadni materijal (**Loh i Ingram, 1982.**). Prednosti navedenih tehnika omogućuju stvaranje novih metodoloških primjena s kognitivnog, praktičnog i ekonomskog stajališta (**Hamon i sur., 1998.; Rovelli i sur., 2000.**).

Konvencionalni model kulture tkiva na čvrstom ili polučvrstom hranjivom mediju prepoznat je kao moćan alat za brzu i masovnu klonsku reprodukciju velikog broja važnih biljnih kultura ali i proizvodnju sekundarnih metabolita. Međutim, konvencionalni model mikropropagacije na čvrstom ili polučvrstom hranjivom mediju predstavlja vrlo skup proces budući da se tehnologija temelji na velikoj uporabi ljudskog ručnog rada uz korištenje velikog broja malih posuda za biljke (**Afreen, 2006.; Mordocco i sur., 2009.**). Procjenjuje se kako ljudski ručni rad iznosi 40 – 60 % cijene biljke proizvedene *in vitro*, a sam proizvodni proces je vrlo teško automatizirati (**Etienne i Berthouly, 2002.**). Stoga je automatizacija sustava u kulturi tkiva vrlo važna u cilju dobivanja velikog broja biljaka. Iz navedenih razloga uporaba čvrstog medija u masovnoj proizvodnji biljaka *in vitro* nije najprikladnija.

1.1.2. Suvremeni imerzni (TIB/TIS) sustav bioreaktora s tekućim hranjivim medijem

U cilju prevladavanja problema koji se javljaju u konvencionalnom modelu mikropropagacije zadnjih 15-ak godina neprekidno se razvijaju i unaprjeđuju protokoli koji koriste bioreaktore s tekućim medijem (**Takayama i Akita, 1994.; Tautorus i Dunstan, 1995.**). Automatizacija procesa proizvodnje biljnog materijala pomoću bioreaktora jedna je od najučinkovitijih metoda u redukciji troškova mikropropagacije (**Aitken-Christie 1995.; Levin i sur., 1998.**).

In vitro mikropropagacija biljnih vrsta upotrebom tekućeg medija smatra se učinkovitijom u odnosu na polučvrsti medij jer biljke u tekućem sustavu imaju veću dostupnost komponentama medija, proizvode veću biomasu i smanjuju potrebno vrijeme propagacije, a također je lakša manipulacija i automatizacija (smanjenje radne snage i troškova), te nema troškova koje iziskuje upotreba gela (agar) kao jednog od glavnih komponenti koje poskupljuju proces razmnožavanja u komercijalnim laboratorijima (**Dutra i sur., 2009.; Oliveira i sur., 2011.; Welander i sur., 2014.; Businge i sur., 2017.**).

U sustavu s tekućim hranjivim medijem mogu se osigurati ujednačeni uvjeti, hranjivi medij se može lako obnoviti mijenjanja posuda, atmosferska ultrafiltracija osigurava aseptične uvjete, a čišćenje posuda nakon ciklusa puno je lakše. Osim toga, posude su veće i mogu se koristiti različiti volumeni, dok se kod medija s agarom koriste ujednačeni volumeni. Vrijeme potrebno za transfer eksplantata može se reducirati iz razloga jer eksplantati nisu pravilno pozicionirani nego u većini slučajeva samo ubačeni u posude gdje su u direktnom kontaktu s tekućim medijem (**Debnath 2011.; Georgiev i sur., 2014.**). U takvim bioreaktorima biljni materijal ili eksplantati u potpunosti su uronjeni u tekući medij što uvelike može ograničiti izmjenu plinova biljnog materijala, te posljedično dovodi do asfiksije i hiperhidriranosti tkiva (**Debergh i Maene, 1984.**). Asfiksija i hiperhidriranost biljnog materijala nepoželjna su fiziološka stanja uzrokovana isključivo niskim sadržajem kisika i smanjenjem vodnog potencijala samog hranjivog medija. Simptomi ovih poremećaja uključuju manjak klorofila, staničnu hiperhidriranost, smanjen razvoj epikutikularnog voska, promjene u enzimskim aktivnostima i sintezi proteina te nisku stopu preživljavanja (**Ziv, 1991a,b.**). Sustav koji kombinira prednosti čvrste i tekuće kulture osmišljen je kako bi se ublažili ovi nedostaci. U cilju prevladavanja ovih nepoželjnih stanja razvijeni su sustavi s djelomičnim uranjanjem ili imerzijom – TIB/TIS bioreaktori (**Georgiev i sur., 2014.**).

Imerzni sustav bioreaktora (TIB, eng. *Temporary Immersion Bioreactor*; TIS, eng. *Temporary Immersion System*) smanjuje pojedine probleme koji su prisutni kod sustava sa stalnim potapanjem biljnog materijala, a to su: hiperhidriranost, slaba kvaliteta biljnog materijala i nužnost presađivanja na čvrsti medij u fazi elongacije i/ili rizogeneze. U usporedbi s konvencionalnim modelom na polučvrstom mediju, TIB/TIS sustav osigurava bolju produkciju biljne mase, veću učinkovitost i stopu proliferacije, a smanjenja je i potreba za radnom snagom (**Escalona i sur., 1999.; Etienne i sur., 2006.**). Tipični dizajn koristi dvije posude (plastična ili staklena) od kojih jedna sadrži medij, a druga biljni materijal (**Adelberg i Simpson, 2002.**). TIB/TIS sustavi razvijeni su prije nekoliko desetljeća u cilju prevladavanja postojećih problema kao što su malformacije i gubici uslijed asfiksije i vitifikacije. Ovaj sustav služi kao alternativa konvencionalnom procesu mikropropagacije, a temeljen je na automatizaciji (**Gianguzzi i sur., 2019.**).

Ovaj sustav obično uključuje cikluse (frekvencije) vlaženja (potapanja, imerzije) biljnog tkiva u tekući medij i sušenja (drenaže), odnosno izlaganja biljnog tkiva mikro

atmosfera posude koji se odvijaju naizmjenično (ciklički) u određenom vremenskom razdoblju te je otuda dobio i naziv „sustav povremene imerzije (TIB/TIS)“. Period imerzije obično je kraći (nekoliko minuta) u odnosu na period izloženosti mikroatmosfera posude (nekoliko sati). Precizna kontrola frekvencije i vremena imerzije može uvelike smanjiti hiperhidriranost (vitifikaciju) biljnog tkiva stvaranjem optimalnih uvjeta vlage i opskrbe hranjivim tvarima (Albarran i sur., 2005.; Georgiev i sur., 2014.). Osim toga TIB/TIS sustav omogućava kontrolu aseptičnih uvjeta, opskrbu hranjivim tvarima i kisikom, rjeđu subkultivaciju, laku promjenu ili modifikaciju medija bez oštećenja biljnog materijala tijekom kultivacijskog ciklusa ili pojedine subkultivacije. Iz tih razloga TIB/TIS sustav smatra se „najprirodnijim pristupom u kulturi tkiva“, (Arencibia i sur., 2008.).

U TIB/TIS sustavu izlaganje biljnog tkiva plinovima u mikroatmosfera olakšava interfazni transport kisika do biljnih stanica što nije slučaj kod upotrebe sustava gdje je biljno tkivo konstantno potopljeno. Na taj način osigurana je bolja izmjena plinova te je smanjena pojava fizioloških poremećaja poput vitifikacije i asfiksije (Georgiev i sur., 2014.).

Razlike između postojećih izvedbi TIB/TIS sustava najčešće su u veličini posude, podlozi za kulturu (*support*), prisutnosti kompjuterizirane kontrole imerzije ili tajmer, uporabi peristaltičke ili zračne pumpe, mehaničkog gibanja posuda za izmjenu tekućine, recikliranja ili brze izmjene pojedinih komponenti medija ili kompletnih posuda s medijem (Etienne i Berthouly, 2002.).

Proteklih je godina u cilju smanjenja troškova ulaganja, uštede prostora i laboratorijskog rada na tržište uvedeno nekoliko izvedbi bioreaktora: RALM bioreaktor (Biorreatores RALM, Ralm Industria e Comércio Ltda., Brazilia), SETIS sustav (Vervit, Belgia, distribuit de Duchefa Biochemie, Olanda), PLANTIMA (A-Tech Bioscientific Co., Ltd., Taiwan), Plantform (Plant Form AB, Suedia & TC propagation Ltd., Irlanda), BOX-IN-BAG i WAVE bioreaktori (Georgiev i sur., 2014.). TIB/TIS sustav je uspješno primijenjen u mikropropagaciji različitih biljnih vrsta kao što su krumpir (*Solanum tuberosum* L.), (Piao i sur., 2003.), kava (*Coffea arabica* L.), (Albarran i sur., 2005.), banana (*Musa* spp. AAB groupa), (Roels i sur., 2005.), visokogrmljika borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.), (Ross i Castillo, 2009.), ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr.),

(Scherer i sur., 2013.), te neke druge drvenaste vrste kao što je pistacio (*Pistacia vera* L.), (Akdemir i sur., 2014.).

Sustav bioreaktora dizajniran je za tekući medij i uglavnom se karakterizira kao zatvoreni aseptični sustav s kontrolom mikro uvjeta (pH, temperatura, kisik, aeracija) i podrškom za monitoring. U ovim sustavima konačni proizvod može biti: biomasa (npr. izdanci ili korijen), embrionalne i organogene stanice, enzimi ili neki drugi metaboliti (Paek i sur., 2005.).

Veliku ekonomsku svrhu bioreaktori imaju i u proizvodnji sekundarnih metabolita, farmaceutskih proizvoda, aromatskih kemikalija, alkaloida i sladila. Poznato je oko 20.000 metabolita koji su dobiveni iz biljaka, a svake godine proizvede se 1.600 novih sekundarnih metabolita (Sajc i sur., 2000.).

Masovna proizvodnja pomoću *in vitro* kulture ima mnoge prednosti, a jedna je i kontrola okolišnih uvjeta (neovisno o vegetacijskom razdoblju biljke, cjelogodišnja proizvodnja), standardni i visoki prinosi, prevencija biotičkih i abiotičkih stresova i mogućnost korištenja velikog kapaciteta proizvodnje (Paek i sur., 2005.).

Prvo istraživanje na sustavu bioreaktora provedeno je pri *in vitro* mikropropagaciji begonije (*Begonia* × *Hiemalis*), (Takayama i Misawa, 1981.). U ovom istraživanju korištene su Erlemeyerove tikvice koje su sadržavale hranjivu MS podlogu (Murashige i Skoog, 1962.) s 1 mg/ml kinetina. Od tada je razvijeno mnogo različitih izvedbi bioreaktora za masovnu mikropropagaciju različitih biljnih vrsta i biljnih organa (Paek i sur., 2001.).

Arencibia i sur. (2013.) su utvrdili da biljke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) uzgajane u TIB/TIS-u (dvostruke posude, eng. *twin-flasks*) imaju veću prilagodljivost u odnosu na biljke kultivirane konvencionalnim metodama na polučvrstom mediju.

1.1.3. Hiperhidriranost ili vitrifikacija u imerznom (TIB/TIS) sustavu bioreaktora i mogućnosti njene kontrole

U imerznom sustavu također postoje određeni nedostaci koji predstavljaju velike izazove mnogim istraživačima, a najčešći su: nedostatak protokola i proizvodnih procedura,

povećanje hiperhidriranosti, malformacije i pomjeranje eksplantata tijekom imerzije, razvoj pjene, oksidacijski stres, sinteza toksičnih spojeva i inhibitora rasta te moguća kontaminacija (Lyam i sur., 2012.).

Glavni nedostatak kultivacije biljaka na tekućem mediju je problem deformacije eksplantata. Biljke imaju tendenciju akumulacije viška vode u tkivu što rezultira poremećajima u morfogenezi i pojavom hiperhidriranosti ili vitrifikacije. Hiperhidriranost (eng. *hyperhydricity*) ili vitrifikaciju prvi puta u svom istraživanju opisuju **Quoirin i Lepoivre (1977.)** na vrsti *Prunus* sp.

Akumulacija prevelike količine vode u tkivu biljaka uzrokuje poteškoće tijekom *in vitro* propagacije, organogeneze, krioprezervacije i aklimatizacije (Ziv, 1991a.). Biljke koje se razvijaju u tekućem mediju su krhke, imaju staklasti izgled i sočne (sukulentne) listove ili izdanke te slab korijenov sustav (Etienne, i sur., 1997.). S fiziološkog gledišta, vitrificirane biljke karakterizira redukcija u sadržaju klorofila i lignina te visoki sadržaj vode (Kevers i sur., 1987.; Olmos i Hellín 1998.). Unatoč napretku u istraživanju drugih biljnih vrsta, morfološka, anatomska i fiziološka svojstva borovnice vezana uz vitrifikaciju nisu detaljno proučena, a uzrok vitrifikacije je i dalje slabo poznat.

Listovi su najčešće pogođeni ovom pojavom, uslijed čega razvijaju neorganizirano mezofilno tkivo koje je izgrađeno uglavnom od spužvastog parenhima s velikim međustaničnim prostorima, deformiranim vaskularnim tkivom i abnormalnom epidermom (Etienne i sur., 2006.).

Kutikula na epidermalnom tkivu kod hiperhidriranih listova nije dobro razvijena ili nedostaje te je obično smanjen razvoj epikutikularnog voska i lignina, a listovi često posjeduju nepravilne stanice puči koje ne mogu odgovoriti na signale zatvaranja, te imaju smanjen sadržaj klorofila (Ziv i sur., 1991a.; Ziv, 2005.). Vitrificirane biljke karakterizira nepravilna distribucija stomatalnog aparata, smanjena gustoća puči i slabije razvijene stanične stijenke s povećanim međustaničnim prostorima u mezofilu (Saher i sur., 2004.; Chakrabarty i sur., 2006.; van den Dries i sur., 2013.; Gao i sur., 2017.). Voda se iz biljnog tkiva normalno gubi putem transpiracije, procesa koji je reguliran otvaranjem puči na listovima. Otvaranje i zatvaranje puči potaknuto je promjenama volumena, osmotskog

tlaka i turgora stanica zapornica. Stomatalni pokreti mogu biti inducirani i stresnim podražajima okoliša, poput suše, solnog stresa te poplave-hipoksije, ali i podražajima uslijed raznih oštećenja i dodira (**Jia i Zhang, 2008.**).

Asfiksija (pomanjkanje kisika) i hiperhidriranost biljnog materijala nepoželjna su fiziološka stanja prouzročena isključivo niskim sadržajem kisika i vodnim potencijalom samog hranjivog medija. Kod mnogih biljaka propagiranih *in vitro*, abnormalna morfologija (anatomske aberacije) rezultira odstupanjem od normalnog tijeka morfogeneze koje se manifestira dalje na biljkama *in vivo* (**Ammirato, 1985.; Ziv, 2000.**).

Hipolignifikacija je povezana s niskom aktivnosti enzima uključenih u sintezu lignina i njihovoj polimerizaciji uslijed stresnih *in vitro* uvjeta kao što su: visoka vlaga, velika koncentracija biljnih regulatora rasta, akumulacija plinova i visoki intenzitet svjetlosti (**Kevers i sur., 2004.; Saher i sur., 2004.**). Ovi stresni uvjeti mogu biti uzrok brze sinteze endogenog etilena koji izaziva smanjenu aktivnost peroksidaze i intenziteta lignifikacije (**Al-Maarri i Al-Ghamdi, 2000.**). Također ovakvo stanje dovodi do smanjenog tlaka turgora, promjena u vodnom potencijalu, odnosno povećanju usvajanja vode što u konačnici dovodi do hiperhidriranosti tkiva (**Dewir, 2014.**)

Prekomjerno nakupljanje vode u biljnom tkivu može rezultirati iscrpljivanjem kisika iz stanica, razvojem oksidacijskog stresa, uslijed prekomjerne pojave reaktivnih kisikovih jedinaka (ROS) koje uzrokuju oštećenja biljnog tkiva (**Sun i sur., 2016.; Muneer i sur., 2016.**). Povećana akumulacija ROS-a i promjene u aktivnostima antioksidacijskih enzima također su utvrđene u vitrificiranim biljkama (**Chakrabarty i sur., 2006.; Tian i sur., 2015., 2017.**).

Nekoliko razvojnih procesa u biljnom tkivu može biti pod utjecajem ROS-a koji vode do gubitka i razvoja nepravilne morfogeneze (**Etienne, 2006.**). ROS kao što je H₂O₂ i hidroksilni radikal HO[•] reagiraju trenutno s gotovo svakom tvari (**Ziv, 2000.**). Dokazano je da ROS utječu na metabolizam etilena (**Li i sur., 2015.**), odnosno etilen može utjecati na pojačanu akumulaciju ROS-a (**Wi i sur., 2010.**). **Gao i sur. (2017.)** pretpostavljaju da su etilen i H₂O₂ uključeni u podražajni signal koji je odgovoran za pokretanje stoma (ključni faktor povezan s pojavom i razvojem vitrifikacije).

Hiperhidriranost utječe i na stopu preživljavanja nakon presađivanja, odnosno uslijed gubitka *in vitro* razvijenih listova u *ex vitro* uvjetima biljke uvenu ili odumru. Dva ključna procesa, fotosinteza i transpiracija nisu potpuno funkcionalni u hiperhidriranim listovima i tkivu, što ujedno rezultira lošim performansama transplantiranih biljaka u *ex vitro* uvjetima (Preece i Sutter, 1991.; Ziv i sur., 1998.). Chakrabarty i sur. (2006.) iznose da je sadržaj klorofila (a i b) i karotenoida bio značajno niži u hiperhidriranim listovima mikroizdanaka jabuke (*Malus sp.*) te Nikam i sur. (2019.) u istraživanju na agavi (*Agave sisalana* Perr. ex Engelm).

Nekoliko je metoda za redukciju hiperhidriranosti: manipulacija s koncentracijama i razinama biljnih hormona ili iona u mediju (Wu i sur., 2011.), različiti intenziteti svjetlosti ili različita sredstva za učvršćivanje (Ascencio-Cabral i sur., 2008.), izbor posuda i obogaćivanje atmosfere s CO₂ (Teixeira da Silva i sur., 2005a,b.) dok je jako malo kemijskih sredstava koja se mogu koristiti u redukciji hiperhidriranosti.

U pokušaju kontrole hiperhidriranosti fokus je stavljen na bolju aeraciju i periodično uranjanje biljaka u hranjivi medij uporabom TIB/TIS imerznog sustava bioreaktora (Escalona i sur., 1999.). Također, preporuča se i povećanje koncentracije agara (Hakkaart i Versluijs, 1983.; Letouze i Daguin, 1983.); upotreba MS medija bez prisustva iona klorida (Quoirin i Lepoivre, 1977.); redukcija koncentracije kalija (Davis i sur., 1977.); povećanje koncentracije kalcija (Kreutmeier i sur., 1984.); uvođenje kobalta u medij (Gaspar i Kevers, 1985.); modifikacija hormonalnog balansa – redukcija koncentracije auksina i/ili citokinina (Boxus i sur., 1978.; Zuccherelli 1979.; Kevers i sur., 2004.); supresija kasein hidrolizata i adenin sulfata (Davis i sur., 1977.); upotreba pektina (Zuccherelli, 1979.) te dodavanje floridzina i floroglucinola u medij (Hegedus i Phan, 1983.). Zatim, preporuča se i modifikacija okolišnih faktora kao što su: hladni tretman (Boxus i sur., 1978.), snižavanje temperature kultivacije (Leffring, 1983.), uzgoj u mraku – tamna faza (Von Arnold, 1982.), povećanje izmjene plinova (Hakkaart i Versluijs 1983.; Ivanova i Staden 2011.) i redukcija relativne vlage (Debergh i Maene 1984.; Zobayed i sur., 2001.).

1.1.4. Nanotehnologija u kulturi biljnog tkiva *in vitro* - primjena nano-SiO₂, nano-ZnO i biljnog regulatora floroglucinola

Nanotehnologija trenutno predstavlja vrlo važno područje u znanstveno-istraživačkom radu s modernim materijalima, a temelji se na nanočesticama koje su specifične po svojoj veličini, obliku i distribuciji (**Jain i sur., 2009.**). Nanočestice imaju vrlo široku primjenu te se koriste za poboljšanje klijavosti sjemena, povećanje rasta i prinosa biljaka, omogućuju genetsku modifikaciju, poboljšavaju proizvodnju bioaktivnih tvari i otpornost biljaka na patogene (**Wang i sur., 2016.; Ruttkay-Nedecky i sur., 2017., Mahendran i sur., 2019.; Rivero-Montejo i sur., 2021.**).

Nanočestice su pokazale svoju važnost u različitim granama biljne biotehnologije. Dokazana je njihova učinkovitost u mnogim istraživanjima, od pojedinih faza kulture tkiva (dezinfekcija, diferencijacija kalusa), stvaranja somaklonalnih varijacija, dobivanja genetski modificiranih organizama do ostalih oblika primjene kao što je produkcija sekundarnih metabolita (**Kim i sur., 2017.**).

U kontroli mikrobiološke kontaminacije najčešće se koriste nanočestice Ag, TiO₂, Zn i ZnO iako je poznato da i mnoge druge nanočestice pokazuju pozitivne učinke u suzbijanju štetnih mikroorganizama (**Prasad i sur., 2014.**) Novije razvijeni nanoresursi kao što su grafen, grafit, *quantum dots*, ugljikove nanotube, polimerni dendrimeri i atomske nakupine nesumnjivo će doprinijeti razvoju biljne biotehnologije zahvaljujući dokazanim učincima na rast gljivica i bakterija (**Álvarez i sur., 2019.**).

Učinak nanočestica u kulturi biljnog tkiva *in vitro*, odnosno indukciji kalusa, organogenezi, multiplikaciji, elongaciji i ukorjenjivanju izdanaka nije dovoljno istražen (**Kim i sur., 2017.**). Stvaranje somaklonalnih varijacija može biti povezano s interakcijom u morfogenezi uslijed dugotrajnog izlaganja nanočesticama. Nanočestice ovisno o svojstvu i interakciji s biljkama uzrokuju mnoge morfološke i fiziološke promjene (**Rastogi i sur., 2017.**). Morfološke promjene u smanjenju biomase pšenice (*Triticum aestivum* L.), smanjenoj germinaciji sjemena krastavca (*Cucumis sativus* L.) te inhibiciji elongacije korijena češnjaka (*Allium sativum* L.) iznose **Du i sur. (2011.), Mushtaq (2011.)** te **Shaymurat i sur. (2012.)**. Fiziološke promjene u vidu povećanja sadržaja klorofila i

karotenoida iznose **Raliya i Tarafdar (2013.)**, **Patra i sur. (2013.)** te **Samadi i sur. (2014.)**. Već je poznato da prisutnost nanočestica može aktivirati nakupljanje bioaktivnih supstanci u stanicama, izdancima i korijenju biljaka kultiviranih *in vitro*. Ovaj fenomen povezan je s produkcijom ROS-a, specifične regulacije gena i aktivnosti antioksidativnih enzima dok odgovorni mehanizmi nisu još do kraja istraženi (**Kim i sur., 2017.**).

Nanočestice posjeduju jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva ali i potencijal u jačanju biljnog metabolizma (**Giraldo i sur., 2014.**). Učinkovitost nanočestica određena je kemijskim sastavom, veličinom, površinskom pokrivenošću, reaktivnošću te dozom ili koncentracijom (**Khodakovskaya i sur., 2012.**). Nanočestice raspršene u atmosferi mogu izravno utjecati na pojedine dijelove biljke budući da pojedine nanočestice (<100 nm) u aerosolu mogu prodrijeti u list kroz puči, proći kroz stabljiku i doprijeti do ostalih dijelova i stanica biljaka (**Wang i sur., 2013.**). Ipak, biljke apsorbiraju nanočestice pomoću korijenovog sustava (selektivna ishrana) iz tla i vode jer se tu češće akumuliraju, a potom ih pomoću biotransformacije i translokacijskih mehanizama pohranjuju u svoje organe (**Rico i sur., 2011.; Tripathi i sur., 2017a,b.**). **Karami Mehrian i Lima, (2016)** su utvrdili tri različita mehanizma važna za prodor nanočestica u stanice koja ovise o veličini, obliku, naboju, hidrofobnosti, kemijskom sastavu i stabilnosti nanočestice. Prvi mehanizam uključuje izravnu difuziju nanočestica kroz lipidni dvosloj; drugi mehanizam je unos endocitozom pri kojoj plazma membrane stvara malu deformaciju oko nanočestice kako bi ju okružila te stvara vezikulu koju unosi u stanicu; treći mehanizam koristi ionski kanal i membranski proteinski transport koji ih provodi putem akvaporina (vodeni kanali u stanici) gdje su limitirajući faktori selektivnost i mala veličina pora. Zabilježeno je i stvaranje novih pora induciranih mehaničkim djelovanjem nanočestica na lipidni dvosloj stanične membrane (**Schmidt, 2015.**). Nanočestica u biljnoj stanici može biti transportirana putem apoplasta ili simplasta, prolazeći plazmodezmijama te kroz ksilem i floem po cijeloj biljci. Efikasnost usvajanja i transporta nanočestica ovisi o biljci, odnosno fiziologiji biljne vrste, a ponekad još uvijek nepoznatim mehanizmima (**Pacheco i Buzea, 2018.**).

Istraživanja su pokazala da biljke mogu apsorbirati brojne nanočestice (**Chen i sur., 2010.; Kurepa i sur., 2010.; Schwab i sur., 2015., 2016.**), transportirati ih (**Liu i sur., 2009.; Cifuentes i sur., 2010.; Zhao i sur., 2012.**) i akumulirati u specifičnim unutarstaničnim prostorima kao što je vakuola, jezgra ili plazmodezmije (**Kurepa i sur.,**

2010.; Schwab i sur., 2016.). Nanočestice utječu i na neke fiziološke procese u biljkama, odnosno na rast i razvoj biljke (Stampoulis i sur., 2009.; Burklew i sur., 2012.; Garcia-Sanchez i sur., 2015.). Pojedine studije ukazuju da određene više koncentracije nanočestica rezultiraju toksičnim učinkom na vaskularne biljke, germinaciju sjemena i promjene u ekspresiji gena (Rico i sur., 2011.; Miralles i sur., 2012.; El-Temsah i Joner, 2012.; Aken Van, 2015.). Međutim neke studije ukazuju da nanočestice imaju i pozitivni utjecaj u ekspresija gena kod vrste *Arabidopsis* te aktivnosti obrambenih mehanizama u biljci (Kaveh i sur., 2013.; Yang i sur., 2017.; Rastogi i sur., 2017.).

Silicij dioksid (SiO_2 , nano- SiO_2) uslijed svjetske potražnje najčešća je nanočestica koja se masovno proizvodi industrijskim putem. Globalna proizvodnja nano- SiO_2 procijenjena je na 185.000 do 1.400.000 tona u 2014 godini (Pulit-Prociak i Banach, 2016.). Kao drugi najbrojniji kemijski element na Zemlji nakon kisika, silicij (Si) je u prirodi vrlo raširen (Epstein, 1999.). SiO_2 se uglavnom može naći u kristalnom obliku (kvarc) ali i kao amorfni materijal (opal i silicijevo staklo) koji predstavlja glavni izvor u industrijskoj proizvodnji nano- SiO_2 . Nano- SiO_2 koristi se u proizvodnji kozmetike, lijekova, tonera za pisače te u prehrambenoj industriji. Ima biomedicinsku i biotehnološku primjenu u terapijama protiv raka (transfekcija DNA, isporuka lijekova i imobilizacija enzima), a koristi se i kao gnojivo u poljoprivredi (Napierska i sur., 2010.). Neke biljke akumuliraju Si u rasponu od 0,1 do 10 % u odnosu na sadržaj suhe tvari (Cherif i Belanger, 1992.). Karakteristike Si kako izvora hraniva tijekom rasta biljaka nisu dovoljno istražene. Veći broj studija utvrdio je kako Si potiče rast biljaka, no u većini slučajeva nije jasno može li se stimulacija rasta pripisati nutritivnom učinku ili ublažavanju biotičkog i abiotičkog stresa (Reezi i sur., 2009.). Biljke s niskim sadržajem Si često su strukturno slabe, imaju abnormalan rast i razvoj te su podložnije biotičkom i abiotičkom stresu u odnosu na biljke s većim sadržajem Si (Rafi i sur., 1997.) Si uslijed trenutnih klimatskih fluktuacija (sušne godine i zalanjenost tla) u budućnosti bi mogao biti prihvaćen kao neophodno biljno hranivo (Liang i sur., 2006.).

Pozitivni učinak Si je vrlo značajan u prevladavanju nekih vrsta abiotičkog i biotičkog stresa tijekom rasta i razvoj biljaka (Ma i Yamaji, 2006.). Pozitivni učinak se očituje kroz pojačanu produkciju fenolnih komponenti i lignina u biljnom tkivu uslijed infekcije bakterijom *Xanthomonas oryzae* (Song i sur., 2016.; Webb i sur., 2010.) i bolesti

polijeganja *Pythium ultimum* kod biljaka krastavca (**Chérif i sur., 1992.**), zatim pojačava otpornost biljaka pšenice na uvjete nedostatka vode - suša (**Gong i sur., 2005.; Tripathi i sur., 2016.**) i visokih temperatura kod biljke *Salvia splendens* (**Soundararajan i sur., 2014.**) te otpornost na solni stres kod biljaka paprike (*Capsicum annuum* L.), (**Manivannan i sur., 2016.**). Si poboljšava otpornost na stresne uvjete mijenjanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima i endogene razine hormona, pospješuje sintezu lignina, hitinaze, fenola, fitoaleksina i glukunaze (**Manivannan i sur., 2016.**), unos hraniva u biljku, mijenja kapacitet vezanja kationa, poboljšava napetost biljnih stanica, održava strukturu puči i sadržaj relativne vlage (**Sahebi i sur., 2015.**) te reducira unos teških metala (**Vaculík i sur., 2009.**).

Fiziološki napredak biljke vezan uz primjenu Si ogleđa se u produkciji veće lisne mase, pojačanoj asimilaciji svjetlosti i poboljšanju neto fotosintetske asimilacije (**Ma i Yamaji, 2006.; Khaliq i sur., 2016.**). Regulacija rada puči ili poboljšanje transpiracije kroz puči ukazuje da Si snažno utječe na vodni režim biljke (**Ming i sur., 2012.**). Polimerizacija Si u stanicama epiderme utječe na integritet stanične stijenke (**Dakora i Nelwamondo, 2003.**) i njihovu strukturnu stabilnost tijekom stresnih uvjeta (**Tripathi i sur., 2016.**).

Dodavanjem Si u medij za kulturu tkiva povećava se stabilnost stanica, tkiva i organa biljaka (**Sivanesan i Park, 2014.**). Rast biljaka *in vitro*, biomasa i anatomija biljaka poboljšana je dodavanjem Si u oblicima kao što su: natrijev silikat (Na_2SiO_3 - 1 ppm) kod jagode (*Fragaria x ananassa* Duch.), (**Braga i sur., 2009.**), kalcijev silikat (CaSiO_3 - 1000 ppm) kod banane (*Musa sp.* Mačã (Silk) banana), (**Asmar i sur., 2013.**) i kalijevog silikata (K_2SiO_3 - 200 ppm) kod begonije i maćuhice (*Begonia semperflorens* Link et Otto i *Viola x wittrockiana* Hort.), (**Lim i sur., 2012.**).

U istraživanju o utjecaju Si na vitrifikaciju *in vitro* biljaka sunčevog zvjezdana (*Ornithogalum dubium*), **Ziv (2010.)** je pokazao da modificirani tekući MS medij (TIB/TIS sustav) s NAA (naftil octena kiselina), BAP (6-benzil aminopurin) i 6 % saharoze znatno smanjuje vitrifikaciju izdanaka i povećava mehaničku napetost, odnosno čvrstoću biljaka. Također, istraživanja provedena na endemičnoj južnokorejskoj vrsti *Cotoneaster wilsoni* pokazala su da modificirani MS medij s dodatkom Si u obliku K_2SiO_3 smanjuje vitrifikaciju (**Sivanesan i sur., 2011.**). Pomoću X-zraka je utvrđeno kako nema tragova Si u vitrificiranim listovima *C. wilsoni*, dok je u ne vitrificiranim listovima Si bio prisutan.

Si održava nisku molekularnu koncentraciju antioksidansa kao što su askorbat, glutation i prolin, koji su vrlo važni osmoliti u osiguravaju osmotske ravnoteže te učinkovito smanjuje stopu LPO - lipidne peroksidacije (**Gunes i sur., 2007.**). Dakle, Si u ksilemskom provodnom snopu regulira mnoge enzimske i neenzimske metaboličke procese u cilju održavanja pravilne osmotske, redoks i ionske ravnoteže. Velika koncentracija produkata LPO nastaje uslijed prekomjernog stvaranja ROS-a koji oštećuju makromolekule nukleinske kiseline, proteine i lipide (**Apel i Hirt, 2004.**). Tijekom nepravilne morfogeneze stanica lista, Si pomaže u održavanju strukture puči (**Asmar i sur., 2013.; Manivannan i sur., 2016.**). Apsorbirani Si se uglavnom taloži u apoplastu pri prolasku vode (**Handreck i Jones, 1968.**). Održavanje vodnog statusa temelj je za metaboličke aktivnosti u tkivu (**Kim, 2006.**).

Prema **Sivanesan i Park (2014.)** u *in vitro* uvjetima dodani Si povećao je morfogenetski potencijal biljnog tkiva. Također, učinak Si može biti uvjetovan i kemijskim oblikom, npr. kod orhideje *Cattleya loddigesii* (**Soares i sur., 2011.**) u obliku kalijevog silikata (K_2SiO_3) poboljšava indukciju izdanaka u usporedbi s natrijevim silikatom (Na_2SiO_3). Prema **Sivanesan i sur. (2011.)** egzogena primjena Si u obliku K_2SiO_3 reducirala je vitrifikaciju kod biljne vrste *C. wilsonii*. **Manivannan i sur. (2016.)** su zaključili kako učinak Si na rast biljaka nije samo pod utjecajem koncentracije K_2SiO_3 nego i koncentracije soli (NaCl) uslijed solnog stresa. Također, tretmani Si povećali su broj puči, koncentraciju proteina vezanih za fotosustav i regulirali redoks homeostatski mehanizam.

Pri razvoju tkiva drvenastih kultura tijekom *in vitro* uvjeta dolazi do mnogih poremećaja, među kojima se ističe posmeđenje bazalnog dijela eksplantata nastalog uslijed fenolne oksidacije eksudata ili rezne površine (presjeka) tkiva. Dokazano je da Si ima sposobnost prevencije fenolnog posmeđenja tkiva kod guave (*Psidium guajava*), a rez na nodijalnom eksplantatu se zatvara silikonskim miksom (**Youssef i sur., 2010.**) bez štetnog utjecaja na proces mikropropagacije.

Nano-struktura SiO_2 nakon adsorpcije može tvoriti film na staničnoj stijenci i smanjiti transpiraciju, povećati otpornost na bolesti i poboljšati rast biljke pod stresom kao što je visoka temperatura i zaslanjenost (**Gillman i sur., 2003.; Stamatakis i sur., 2003.; Locarno i sur., 2011.; Lim i sur., 2012.; Shetty i sur., 2012.**). Također, nano struktura SiO_2 može poboljšati krutost (napetost) stanične stijenke (**Lin Bao i sur., 2004.**). Si dodan

hidroponskoj otopini poboljšao je kvalitetu cvjetova gerbera (*Gerbera jamesonii*), (Savvas i sur., 2002. i 2007.; Kamenidou i sur., 2010.). Avestan i sur. (2015.) iznose pozitivne učinke nano-SiO₂ u *in vitro* proliferaciji eksplantata vegetativne podloge jabuke (*MM106*) na MS mediju u ne stresnim uvjetima. Autori navode izraženi rast s povećanjem svježe i suhe mase, indukcije izdanaka te sadržaja klorofila. Najučinkovitija koncentracija nano-SiO₂ bila je 100 mg/L SiO₂.

Niska koncentracija nano-SiO₂ poboljšava germinaciju sjemena rajčice (*Lycopersicum esculentum* Mill.), (Siddiqui i Al-Whaibi, 2014.). Prema Suriyaprabha i sur. (2012.) nano-SiO₂ povećava germinaciju sjemena (klijavost) kukuruza (*Zea mays* L.) osiguravajući bolju dostupnost hraniva, pH i konduktivitet hranjivog medija. Bao-shan i sur. (2004.) primijenili su egzogeno nano-SiO₂ na biljkama vrste *Larix olgensis* i utvrdili kako je nano-SiO₂ poboljšao rast i kvalitetu biljaka, uključujući visinu, promjer i dužinu korijena, broj bočnog korijena i sintezu klorofila. Pod abiotičkim stresom (solni stres - NaCl) dodatak nano-SiO₂ povećao je germinaciju (klijavost) sjemena rajčice i tikvice (*Cucurbita pepo* L.) te stimulirao antioksidativni sustav (Haghighi i sur., 2012.; Siddiqui i sur., 2014.). Shah i Belozeroва (2009.) testirali su nanočestice silicija, paladija, zlata i bakra te utvrdili značajan utjecaj svih nanočestica na germinaciju sjemena salate. Egzogeni tretman nano-SiO₂ i nano-TiO₂ poboljšao je germinaciju sjemena soje te aktivnost nitratne reduktaze (Lu i sur., 2002.) ali i sposobnost sjemena da apsorbira i koristi vodu i nutrijente (Zheng i sur., 2005.). U uvjetima solnog stresa tretman nano-SiO₂ povećao je svježiu i suhu masu lišća, sadržaj klorofila i akumulaciju prolina. Povećanje u akumulaciji prolina, slobodnih aminokiselina, sadržaja hranjiva, antioksidativne aktivnosti upotrebom nano-SiO₂ poboljšava otpornost biljke na abiotički stres (Haghighi i sur., 2012.; Li i sur., 2012.; Kalteh i sur., 2014.; Siddiqui i sur., 2014.). Nano-SiO₂ pospješuje rast i razvoj biljke povećanjem parametara izmjene plinova, fluorescencije klorofila kako što su NET fotosintetska stopa, transpiracija, provodljivost puči, potencijalna aktivnost fotosustava PSII, efektivna fotokemijska učinkovitost, stvarna fotokemijska učinkovitost, transport elektrona i fotokemijsko gašenje (Xie i sur., 2011.; Siddiqui i sur., 2014.).

Cink (Zn), cink-oksidi (ZnO) se nalazi u sastavu Zemljine kore kao mineral cinkit, a za komercijalnu upotrebu se dobiva sintetskim postupcima. Izvrstan je kao poluvodič s

ogromnim znanstvenim i tehnološkim interesom, pogotovo u energetici kao metal i kemijski spoj koji posjeduje brojna svojstva (**Huang i sur., 2001.; Vayssieres i sur., 2001.**).

Nano-ZnO koristi se u velikoj mjeri u poljoprivredi kao pesticid, fungicid i gnojivo (**Kah i Hofmann, 2014.**) te ima raznu primjenu u pojedinim industrijama. Zbog svojih reflektivnih svojstava i sposobnosti da filtrira ultraljubičasti spektar (UVA i UVB) koristi se u kremama za zaštitu kože od sunca. Svjetska proizvodnja procijenjena je na 32.000 tona do 36.000 tona u 2014 (**Pulit-Prociak i Banach, 2016.**).

Ion cinka (Zn^{2+}) ima dvojak, pozitivni i toksični učinak na biljne stanice. Zn aktivira mnoge enzime kao što su: RNA polimeraza, superoksid dismutaza, alkohol dehidrogenaza, karboanhidraza, itd. Također sudjeluje i u proteosintezi i metabolizmu ugljikohidrata, lipida i nukleinskih kiselina te kontrolira transkripciju u proliferaciji i diferencijaciji stanica (**Palmer i Guerinot, 2009.**). Zn igra važnu ulogu u sintezi proteina, integritetu membrana i sudjeluje kao regulator mnogih fizioloških funkcija (**Shi i Cai, 2009.**). Osim toga Zn ima važnu ulogu u razvoju kloroplasta i nekih njegovih funkcija kao što su reparacija fotosustava PSII recikliranjem proteina D1 oštećenog svjetlosnim zračenjem ili aktivnosti SPP peptidaze (**Hänsch i Mendel, 2009.**). Iz navedenog je vidljivo kako nedostatak iona Zn u biljkama dovodi do poremećaja aktivnosti enzima koji vode do inhibicije fotosinteze. Zn je kofaktor enzima karbohidraze koji povećava sadržaj CO_2 u kloroplastu, a time povećava sposobnost karboksilacije enzima Rubisco (**Salama i sur., 2006.**).

Nedostatak Zn izaziva razne malformacije tijekom razvoja biljke. Tako se u slučaju akutnog nedostatka Zn kod biljaka porodice *Poaceae* javlja patuljasti rast, kloroza i sterilitet klasića (**Sharma i sur., 2013.**). Načelo toksičnosti uslijed viška iona Zn temelji se na činjenici njegovog vezanja na mjesta u stanicama namijenjenim drugim biološki aktivnim ionima (**Krämer, 2010.**). Neki od tipičnih simptoma sufcita Zn očituju se u klorozi mladih listova (manje usvajanje iona Fe), smanjenju biomase i inhibiciji rasta korijena (**Ren i sur., 1993.; Broadley i sur., 2007.**).

Nano-ZnO dodan u MS medij potiče somatsku embriogenezu, grananje i regeneraciju izdanaka banane, također inducira sintezu prolina, aktivnost superoksid-dismutaze, katalaze i peroksidaze, klorofila, antioksidativnih enzima te na taj način poboljšava otpornost na

biotički stres uzrokovan kontaminacijom mikroorganizmima u *in vitro* uvjetima (**Helaly i sur., 2014.**). Isti autori navode pozitivni učinak nanočestica ZnO na sadržaj i omjer klorofila a i b. Omjer klorofila a i b pokazatelj je veličine antenskog kompleksa fotosustava I i II (**Parida i Das, 2005.**). Jezgru antenskog kompleksa čini samo klorofil a, dok periferni dio sadrži klorofila a i b. Stoga, više vrijednosti omjera klorofila a i b upućuju i na veću učinkovitost fotosustava I i II u antenskom kompleksu te posljedično na bolji kapacitet fotosinteze, čak i u stresnim uvjetima (**Helaly i sur., 2014.**).

Pojedina istraživanja i studije govore o sposobnosti ZnO da inhibira rast gljivica *Botrytis cinerea* utječući na stanične funkcije što dovodi do deformacije micelija. Nano-ZnO inhibira rast konidiofora i konidija kod vrste *Penicillium expansum* uslijed čega dolazi do njihovog odumiranja (**Abd-elsalam, 2013.**). Nano-ZnO inhibira klijanje sjemena, rast izdanaka i biomasu kalusa, ali inducira rizogenezu eksplantata (izdanaka) i povećava sadržaj sekundarnih metabolita u kalusu, izdancima i korijenu biljaka gorušice (*Brassica nigra* L.) (**Zafar i sur., 2016.**). Također poboljšava rast kalusa i regeneraciju u uvjetima solnog stresa kod biljaka rajčice (*Solanum lycopersicum* Mill.), (**Alharby i sur., 2016.**).

Mnoga istraživanja su utvrdila kako nano-ZnO stimulira rast i razvoj biljaka. **Prasad i sur. (2012.)** su primijenili nano-ZnO na kikirikiju (*Arachis hypogaea* L.), **Sedghi i sur. (2013.)** na soji (*Glycine max* L.), **Ramesh i sur. (2014.)** na pšenici (*Triticum aestivum* L.) i **Raskar i Laware (2014.)** na luku (*Allium cepa* L.), te zaključili da niske koncentracije nano-ZnO korisno djeluju na klijanje sjemena, dok pri višim koncentracijama nano-ZnO ima suprotni učinak. Utjecaj nanočestica na germinaciju ovisi o koncentraciji nanočestica te varira kod različitih biljnih vrsta. **de la Rosa i sur. (2013.)** primijenili su različite koncentracije nano-ZnO na biljkama krastavca (*Cucumis sativus* L.), lucerne (*Medicago sativa* L.) i rajčice (*Solanum lycopersicum* L.) te zabilježili pozitivni učinak na klijanje jedino kod sjemenki krastavca. **Raliya i Tarafdar (2013.)** su utvrdili da je nano-ZnO utjecao na značajno povećanje biomase biljke *Cyamopsis tetragonoloba*, rast izdanaka i korijena, masu korijena, sintezu klorofila i proteina, mikrobiološku populaciju rizosfere, aktivnost alkalne fosfataze i fitaze u rizosferi. Pomoću SEM mikroskopa i plazma/atomske spektrofotometrije utvrđeno je da korijen biljaka vrsta *Vigna radiata* i *Cicer arietinum* apsorbira nano ZnO koji pozitivno utječe na dužinu korijena i biomasu izdanaka (**Mahajan i sur., 2011.**).

Latef i sur., (2017.) kako bi procijenili učinak nanočestica ZnO zalijevali su biljke lupine (*Lupinus termis* L.) koje su bile izložene povećanom salinitetu tla (solni stres). Isti autori iznose pozitivni učinak nano-ZnO u koncentraciji od 60 mg/L na rast biljaka i povećanje sadržaja fotosintetskih pigmenata, fenolnih komponenti, askorbinske kiseline i drugih antioksidativnih enzima. **Singh i sur. (2016.)** usporedili su učinak ZnSO₂ i nano-ZnO na germinaciju i održivost klijanaca rajčice (*Solanum lycopersicum* L.) te sadržaj klorofila, intenzitet antioksidacijske aktivnosti i lipidne peroksidacije. Nanočestice ZnO u usporedbi s ZnSO₄ imale su pozitivni učinak na promatrane parametre ali pri nižoj koncentraciji od 1,2 mM. Više koncentracije nanočestica od 6,1 mM imale su štetni učinak na biljke koji se očitovao u vidu smanjenja sadržaja vode u tkivu te klorofila kao i smanjenju antioksidativne aktivnosti i peroksidacije lipida (uslijed prekomjerne produkcije radikala ROS-a). Intenzitet zelene boje lišća posljedica je prisutnosti fotosintetskih pigmenata (klorofila). U procesu fotosinteze karotenoidi pomažu pri hvatanju svjetlosti ali druga bitnija funkcija mu je u obrani od nakupljanja H₂O₂ kao sastavnog dijela ROS-a (**Triantaphylidès i Havaux, 2009.;** **Yang i sur., 2020.**). Stoga, povećanje sadržaja klorofila i karotenoida u biljnom tkivu biljaka korijandera (*Coriandrum sativum* L.) možda je posljedica povećanja produkcije H₂O₂ uslijed izloženosti biljnog materijala visokim i toksičnim koncentracijama cinka (**Ruiz-Torres i sur., 2021.**).

Nanočestice ZnO kod biljke heljde (*Fagopyrum esculentum* Moench.) pri višim koncentracijama (10 do 2000 mg/L) rezultirale su signifikantnom redukcijom biomase, oštećenjem stanica korijena i visokom aktivnošću antioksidativnog obrambenog sustava uslijed akumulacije ROS spojeva (**Lee i sur., 2013.**). ROS (reaktivni oblici kisika) predstavlja djelomično reducirane oblike atmosferskog kisika poput radikala superoksida O₂⁻, vodikovog peroksida H₂O₂ i hidroksilnog radikala OH koji su vrlo reaktivni i mogu izazvati oksidacijski stres u organizmu (**García-Gómez i sur., 2017.**). Visoka koncentracija Zn u biljnom tkivu može utjecati na stvaranje slobodnih radikala te posljedično podizanja razine MDA - malondialdehida (**Gaschler i Stockwell, 2017.**). Povećana koncentracija MDA kao produkta peroksidacije lipida posljedica je djelovanja ROS-a u stanicama (**Tripathi i sur., 2017.**). Biljke suočene s oksidacijskim stresom uslijed stvaranja ROS-a aktiviraju obrambeni antioksidacijski enzimski sustav koji djeluje putem određenog skupa enzima kojeg čine askorbat peroksidaza, peroksidaza, katalaza i koji igraju važnu ulogu u zaštiti staničnih komponenti od oksidativnih oštećenja uzrokovanih određenim stresnim

stanjima ili pak apsorpcijom teških metala u biljci, primjerice cinka (**Israel García-López i sur., 2018.**).

Floroglucinol (PG; 1,3,5-trihidroksibenzen ili floroglucin) predstavlja jedan od produkata degradacije (razgradnje) floridzina (2-glukozid floretske kiseline). Floroglucinol je benzenetriol (derivat trinitrobenzena) koji se u prirodi pojavljuje u obliku A-prstena spoja flavonoida i mnogih drugih fenolnih komponenti biljaka. Prirodno se pojavljuju bioaktivni spojevi floroglucinola izolirani iz raznih biljaka, morskih algi (porodica *Phaeophyceae* i *Fucaceae*) te mikroorganizama. Derivati floroglucinola pripadaju glavnoj klasi sekundarnih metabolita koji se često pojavljuju u nekoliko porodica *Myrtaceae*, ali i nekim drugim poput *Guttiferae*, *Euphorbiaceae*, *Aspidiaceae*, *Compositae*, *Rutaceae*, *Rosaceae*, *Clusiaceae*, *Lauraceae*, *Crassulaceae*, *Cannabinaceae* i *Fagaceae* (**Pal Singh i Bharate, 2006.**). To je fenolni spoj poznat po utjecaju na regulaciju rasta (**James i Thurbon, 1979.; Kumar i sur., 2005.**). Spoznaja o fiziološkoj relevantnosti floroglucinola u biljkama je ograničena iako je poznato da tkivo jabuke (*Malus sp.*) akumulira veliku količinu floroglucinola vjerojatno kao posljedicu utjecaja različitih patogena (**Gosh i sur., 2010.**), što sugerira kako je floroglucinol vrlo važna komponenta u odgovoru na napad biljnih patogena.

Strukturno srodni glikozid floridzin ima identični učinak kao i floroglucinol, ali je neotporan na zagrijavanje i puno skuplji. Floridzin se metabolizira u floroglucinol i floretsku kiselinu. Floretska kiselina povećala je udio izdanaka vegetativne podloge jabuke *M7* koji se mogu ukorijeniti (**Jones i Hatfield, 1976.**) i dovela do *in vitro* elongacije korijena papaje (*Carica papaya* L.), (**Ascencio-Cabral i sur., 2008.**) ali je bila manje aktivna nego floroglucinol koji ima inhibitorski efekt (**Snir, 1983.; Kooi i sur., 1999.; George i sur., 2010.**). Slijedom navedenog floroglucinol i njegovi prekursori (kao što je floridzin) ili produkti metabolizma (kao što je florenska kiselina) imaju potencijalni učinak u rastu i razvoju mnogih biljaka kada druge fenolne komponente ili biljni regulatori rasta imaju inhibitorski učinak.

Iako se floroglucinol često koristi kao dodatak drugim regulatorima rasta *in vitro*, rijetko je bio u fokusu znanstvenih studija iz razloga jer je njegov pravi učinak maskiran prisutnošću drugih češće korištenih biljnih regulatora (**Jain i sur., 2009.; Ceasar i sur., 2010.; Bairwa i sur., 2012.**). Međutim iz takvih studija vidljivo je da je došlo do poboljšanja

rasta i razvoja biljaka što jasno ukazuje na potencijal floroglucinola (**Teixeira da Silva i sur., 2013.**). Još uvijek postoje mnoge biljne vrste za koje nema opisanog efikasnog *in vitro* protokola. Također, neučinkovita regeneracija u krioprezervaciji i vitrifikacija u kulturi tkiva izazvana slabom lignifikacijom može ugroziti učinkovitost protokola pojedinih drvenastih ili zeljastih kultura. Postoje i druga rješenja u prevladavanju ovih nedostataka kao što su upotreba plinopropusnih posuda ili obogaćivanje atmosfere s CO₂ (**Teixeira da Silva i sur., 2005a,b.**), ali troškovi i tehnički zahtjevi koji su potrebni često premašuju sredstva mnogih znanstvenika koji se bave istraživanjima u kulturi tkiva. Stoga su potrebna alternativna rješenja u prevladavanju ovakvih situacija. Otkriveno je kako floroglucinol ima dalekosežniji učinak i širi potencijal upotrebe, osim kao biljni regulator *in vitro* rasta i razvoja. Jedan od velikih problema transgenih studija (**Teixeira da Silva i sur., 2011.**) u *in vitro* propagaciji orhideja (*Orchidaceae*) je osjetljivost biljnog materijala na biljne regulatore koji se uobičajeno koriste te bi floroglucinol mogao pružiti povoljnu alternativu trenutnim protokolima koji su rezultirali lošim uspjehom. Štoviše, floroglucinol se pokazao uspješnim u krioprezervaciji i regeneraciji hibridnog sjemena vrste *Dendrobium* (**Galdiano i sur., 2012.**).

Iako postoji široka primjena floroglucinola u medicini i farmaciji njegova primjena u biologiji biljaka još je uvijek vrlo limitirana. Fitokemijska ispitivanja na nekoliko vrsta roda *Hypericum* koji se koriste u tradicionalnoj medicini otkrila su prisutnost derivata floroglucinola (**Kim i sur., 2003.**) koji posjeduju citotoksičnu, apoptotsku, antibakterijsku, antioksidacijsku, antidepresivnu i protuupalnu aktivnost (**Winkelmann i sur., 2003.; Athanasas i sur., 2004.; Ahn i sur., 2007.; Crockett i sur., 2008.; Kong i sur., 2009.; Saddique i sur., 2010.; Odabas i Ćirak 2011.; Stein i sur., 2012.**).

Floroglucinol bi mogao pružiti potencijalnu primjenu u biljnoj kulturi tkiva *in vitro* i kao antimikrobno sredstvo. Poluvrijeme raspada floroglucinola i njegovih derivata nije poznato, a njegova sposobnost autoklaviranja ga čini atraktivnom alternativom za antibiotike. Mogao bih poslužiti i kao sterilizant medija za kulturu tkiva bez potrebe za autoklaviranjem, slično klorin dioksidu (**Cardoso i Teixeira da Silva, 2012.**). Floroglucinol se trenutno koristi pri Wiesner testu (PG-HCL reagens) u kojem tkivo biljke koje sadrži lignin boji u crveno (**Christiernin i sur., 2005.; Galla i sur., 2011.**).

Floroglucinol kristalizira iz vode kao dihidrat s talištem od 116 do 117 °C, a kao anhidrat se topi tek pri 218 do 220 °C. Postojani oblik sublimira te zagrijavanjem i kuhanjem ostaje netaknut (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). To čini floroglucinol rezistentnim na autoklaviranje te je vrlo primjenjiv u biljnoj kulturi tkiva. Činjenica da se floroglucinol ne mora dodatno sterilno filtrirati, pojednostavljuje njegovu upotrebu u *in vitro* kulturi. U kulturi tkiva floroglucinol se u hiperhidriranom tkivu obično sintetizira u malim količinama ili se uopće ne sintetizira. Određeni enzimi, posebice p-kumarat / CoA ligaza, pokazuje značajno manju aktivnost u hiperhidriranim eksplantatima. Dodavanjem floridzina ili floroglucinola u hranjivi medij kod *in vitro* izdanaka jabuke i suncokreta sprječava se hiperhidriranost povećavanjem aktivnosti enzima uključenih u sintezu lignina (**Phan i Hegedus, 1985.**).

Dodavanje floroglucinola kao prekursora u biosintezi lignina rezultiralo je smanjenjem hiperhidriranosti i povećanjem multiplikacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u tekućem mediju. Presjeci izdanaka borovnice obojani toluidin plavom bojom rezultirali su većom lignifikacijom tkiva u odnosu na kontrolu (bez floroglucinola) te razvojem ksilema sličnom izdancima s polučvrstog medija (**Ross i Castillo, 2009.**).

Phan i Letouze (1982.) su primijetili kako su fenolne komponente obilnije u normalnim biljkama *Prunus avium* L., nego u hiperhidriranim biljkama. Produkcija fenola izravno je povezana s omjerom C/N i lignifikacije. Dodavanje floroglucinola i floridzina u hranjivi medij može pomoći biljkama koje prolaze kroz hiperhidriranost da se vrate u normalno stanje, odnosno obrnuti smjer iz hiperhidriranosti ka normalnom stanju (**Al-Maarri i Al-Ghamdi, 2000.**). **Pérez i sur. (2016.)** iznose pozitivne učinke floroglucinola u koncentraciji od 158 µM na povećanje sadržaja klorofila (a i b) u listovima papaje (*Carica papaya* L.) tijekom aklimatizacije dok je sadržaj karotenoida bio u pozitivnoj korelaciji jedino s niskim sadržajem šećera (bez šećera) u hranjivom mediju. **Gómez-Kosky i sur. (2021.)** u fazi ukorjenjivanja izdanaka šećerne trske (*Saccharum* spp. cv C90-469) iznose pozitivni učinak floroglucinola u koncentraciji 20 mg/L na vrijednost ukupnih klorofila koja je bila vrlo visoka. Također, **Manokari i sur. (2021.)** iznose pozitivne učinke floroglucinola na povećanje sadržaja klorofila (a i b) te karotenoida. Sadržaj klorofila u listovima ključan je pokazatelj fotosintetske aktivnosti dok su karotenoidi ključni za obrambeni mehanizam protiv oksidacijskog stresa (**Shah i sur., 2017.**). Iz navedenog **Manokari i sur. (2021.)**

pretpostavljaju da abiotski stres uzrokovan višim koncentracijama floroglucinola u hranjivom mediju negativno utječe na sadržaj pigmenata klorofila dok povećanje sadržaja karotenoida štiti fotosintetski aparat od stresa uslijed štetnog utjecaja visoke koncentracije floroglucinola.

Preliminarni rezultati na vrsti *Acca sellowiana* (O.Berg) Burret u permanentnom imerznom bioreктору ukazuju na pozivan učinak floroglucinola u prevenciji pojave hiperhidriranih izdanaka (**Ross i Grasso, 2010.**). Floroglucinol je uspješno primijenjen i u prevenciji hiperhidriranosti kod vrsta *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. i *Vaccinium corymbosum* L. (**Ross, 2006.**).

Sarkar i Naik (2000.) iznose učinkovitost floroglucinola (0,8 mM) u promociji izdanaka šest genotipova krumpira (*Solanum tuberosum* L.) uz povećanje svježe mase, broja izdanaka i broja induciranih korjenčića. Indukcija pupoljaka paprike (*Capsicum annuum* L.) s 400 μ M PG povećala se za 17 do 18 % u istraživanju **Kumar i sur. (2005.)**.

Izraženi stimulativni učinak 1,28 μ M floroglucinola na broj izdanaka maline (*Rubus ideaus* L.) utvrđen je u kombinaciji sa svim primijenjenim koncentracijama citokinina i auksina, a najoptimalniji medij sadržavao je 4,44 μ M BAP i 0,5 μ M IBA s 1,28 μ M floroglucinola. Mjesečna multiplikacija je bila 1:6 u prisustvu floroglucinola, odnosno 1:4 bez floroglucinola (**James i sur., 1980.**).

Floroglucinol dodan u medij za ukorjenjivanje zajedno s auksinima ponekad stimulativno djeluje na ukorjenjivanje. **Hammatt (1994.)** je utvrdio povećanje ukorijenjenih izdanaka korištenjem medija s auksinima uz floroglucinol u koncentraciji od 1 mM. Floroglucinol primijenjen sam ili u kombinaciji s drugim stimulatorima rasta ukazuje na sposobnost stimulacije rizogeneze, inicijacije izdanaka i somatske embriogeneze. Ovaj fenolni spoj otvara nove putove kao regulator rasta u klonskoj propagaciji izdanaka, kratkoj ili dugoj prezervaciji biljnog materijala, kao promotor indukcije rizogeneze i ubrzanja rasta te kao sredstvo za redukciju hiperhidriranosti kroz poboljšanje lignifikacije u sustavima bioreaktora.

Iz svega navedenog vidljiva je interesantna primjenjivost nanočestica i floroglucinola u mikropropagaciji biljnih kultura, odnosno prevladavanju stresnih uvjeta koji se javljaju u

suvremenim imerznim bioreaktorima nove generacije. Iz tog je razloga potrebno istražiti potencijalne korisne učinke primjene nanočestica SiO₂, ZnO i biljnog regulatora floroglucinola, u cilju sprječavanja nepoželjne vitrifikacije biljnog tkiva te definiranja učinkovitih metoda uporabe imerznih bioreaktora.

1.2. Cilj istraživanja

Osnovni ciljevi istraživanja su:

1. Utvrđivanje intenziteta vitrifikacije pri različitim uzgojnim uvjetima u TIB/TIS sustavu obzirom na tretmane, kako bi ispitali mogu li primijenjene nanočestice SiO₂, ZnO i/ili floroglucinol pozitivno utjecati na njezino smanjenje.
2. Utvrđivanje učinka primijenjenog modela na rast i razvoj (produktivnost) borovnice u TIB/TIS sustavu.
3. Utvrđivanje učinka primijenjenog modela na fiziološke pokazatelje stresa i antioksidativnog statusa u biljkama borovnice *in vitro*.
4. Razvoj učinkovitog modela u sprječavanju vitrifikacije biljaka borovnice u tekućem imerznom sustavu nanobiotehničkim pristupom uz primjenu nanočestica SiO₂, ZnO i floroglucinola.

Osnovne hipoteze istraživanja su:

1. Si i Zn će imati različiti stupanj bioakumulacije u biljci s obzirom na primijenjene koncentracije.
2. Primjena nanočestica SiO₂, ZnO i floroglucinola u optimalnoj koncentraciji poboljšati će rast i razvoj biljnog materijala u tekućem imerznom (TIB/TIS) sustavu bioreaktora.
3. Primjena nanočestica SiO₂, ZnO i floroglucinola u optimalnoj koncentraciji utjecati će na promjenu koncentracije pojedinih bioaktivnih komponenti, multiplikaciju te poboljšanje morfoloških i fizioloških parametara biljaka borovnice uz smanjenje štetne vitrifikacije u imerznom TIB/TIS sustavu.

2. MATERIJAL I METODE RADA

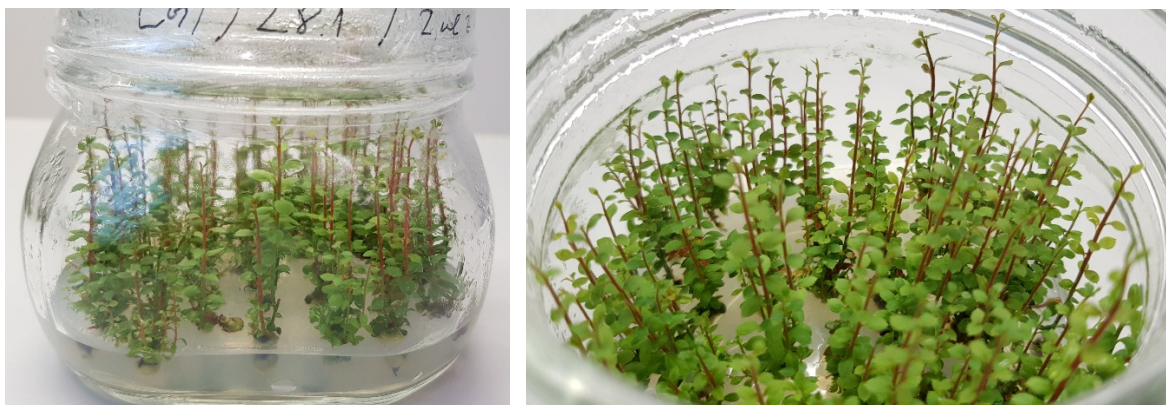
Istraživanje je provedeno u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS). Laboratorij posjeduje svu opremu potrebnu za uspješno provođenje mikropropagacije (laminarni stol/kabinet, autoklav, magnetna miješalica, pH metar, sterilizator, pincete, skalpeli, TIB/TIS – SETIS[®] sustav bioreaktora, itd.), matični biljni materijal (matičnjak – prijavljen u centru za rasadničarstvo pri HAPIH-u), prostor za aklimatizaciju, klima komoru s kontroliranim uvjetima potrebnim za razvoj *in vitro* biljaka u pojedinim fazama mikropropagacije (Slika 1.).



Slika 1. Laboratorij za uzgoj biljaka *in vitro* (Foto: D. Bošnjak, 2019.)

2.1. Postavljanje istraživanja

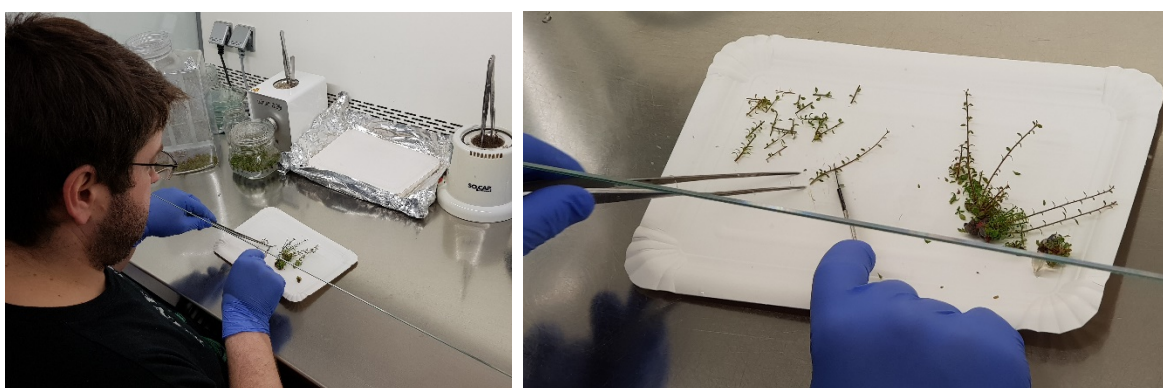
Istraživanje je provedeno na voćnoj vrsti borovnici (*Vaccinium corymbosum* L.), koja je prethodno uvedena u *in vitro* kulturu.



Slika 2. Biljke borovnice na polučvrstom mediju (Foto: D. Bošnjak, 2020.)

Priprema biljnog materijala, hranjivog medija i multiplikacija biljkama obavljena je u sterilnim uvjetima u laminarnoj komori (Iskra PIO, MC 15-1). Sva oprema, posuđe, pribor i medij korišteni u istraživanju sterilizirani su u autoklavu (Inko lab d.o.o., vertikalni autoklav) na 121 °C u trajanju od 20 minuta pri tlaku od 1,2 bara. Radni prostor u laminarnoj komori steriliziran je 70 %-tnim etanolom i UV svjetlom u trajanju od 30 minuta.

Biljke borovnice (izdanci) disecirane su na nodijalne eksplantate veličine 1 do 2 cm s dva do tri internodija (bočna pupa s listom) te potom preneseni u sterilni bioreaktor, odnosno komoru (posudu) za biljni materijal (Slika 3.).



Slika 3. Disekcija i prijenos eksplantata borovnice u bioreaktor (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

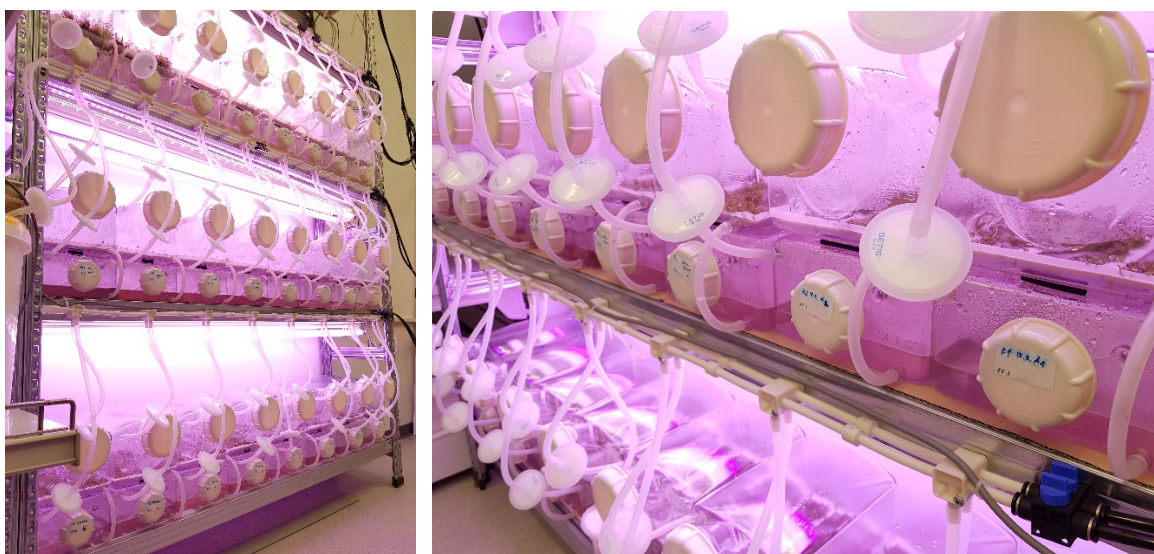
U istraživanju je korišten gotovi tekući hranjivi medij WPM (Lloyd i McCown, 1981.) proizvođača Duchefa Biochemie (Nizozemska). Hranjivi medij sadržavao je mikro- i makroelemente koji su navedeni u tablici 1., uz dodatak 30 g/L šećera, 2 mg/L zeatina (citokinin), 2 ml/L PPM™ (*Plant Preservative Mixture* – Plant Cell Technology, USA) i pojedinih tretman nanočestica SiO₂, ZnO te floriglucina.

pH medija (5,0) podešen je s 1N NaOH i 1N HCl. Svaki bioreaktor sadržavao je 0,75 L tekućeg hranjivog medija. Nanočestice definiranih veličina SiO₂ (10 – 20 nm), ZnO (20 – 30 nm) te biljni regulator floriglucinol u određenim koncentracijama dodani su direktno u tekući hranjivi medij prije autoklaviranja.

Nakon postavljanja pokusa svi tretmani (bioreaktori) postavljeni su u klima komoru uz fotoperiod 16/8 (svjetlo/mrak; intenzitet svjetlosti u svijetloj fazi iznosio je 3850 lux-a) i temperaturu od 23 ± 1,5 °C do završetka ciklusa (Slika 4.).

Tablica 1. Sastav WPM hranjivog medija korištenog u istraživanju

Mikroelementi (mg/l)		Makroelementi (mg/l)		Vitaminski (mg/l)	
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,25	CaCl ₂	72,50	Glicin	2,00
FeNaEDTA	36,70	Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	471,26	Myo-inositol	100,00
H ₃ BO ₃	6,20	KH ₂ PO ₄	170,00	Nikotinska kiselina	0,50
MnSO ₄ x H ₂ O	22,30	K ₂ SO ₄	990,00	Piridoksin HCl	0,50
Na ₂ MnO ₄ x 2H ₂ O	0,25	MgSO ₄	180,54	Tiamin HCl	1,00
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,60	NH ₄ NO ₃	400,00		

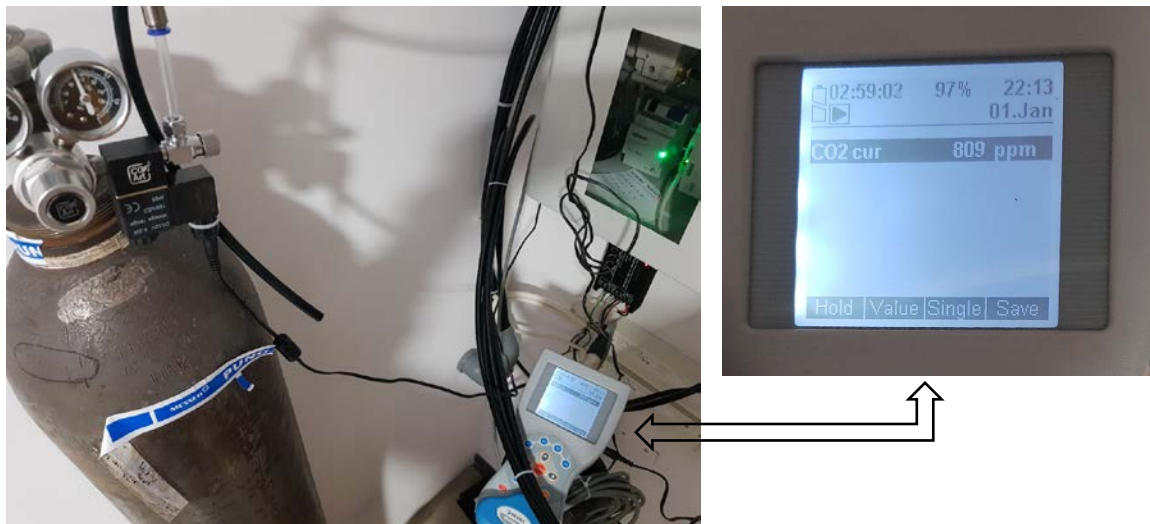


Slika 4. Bioreaktori u kontroliranim uvjetima (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Frekvencija imerzije na kontrolnoj jedinici imerznog sustava (CPU) postavljena je u režim od 1 imerzije (potapanja) u danu, odnosno svakih 24 sata u trajanju od 3 minute te ventilaciju sustava (slobodna izmjena plinova s vanjskom atmosferom) svaka 3 sata u trajanju od 2 minute (8 puta u danu).

Jedanput dnevno kroz prvih 20 dana u svijetloj fazi (dan) atmosfera bioreaktora obogaćena je s CO₂ u koncentraciji od 1000 ppm čime je bila u potpunosti zadana kontrolna modifikacija potrebnih fotomiksotrofnih uvjeta za aklimatizaciju i regeneraciju. Upuštanje CO₂ izvršeno je putem natlačene boce i elektromagnetnog ventila dok se koncentracija

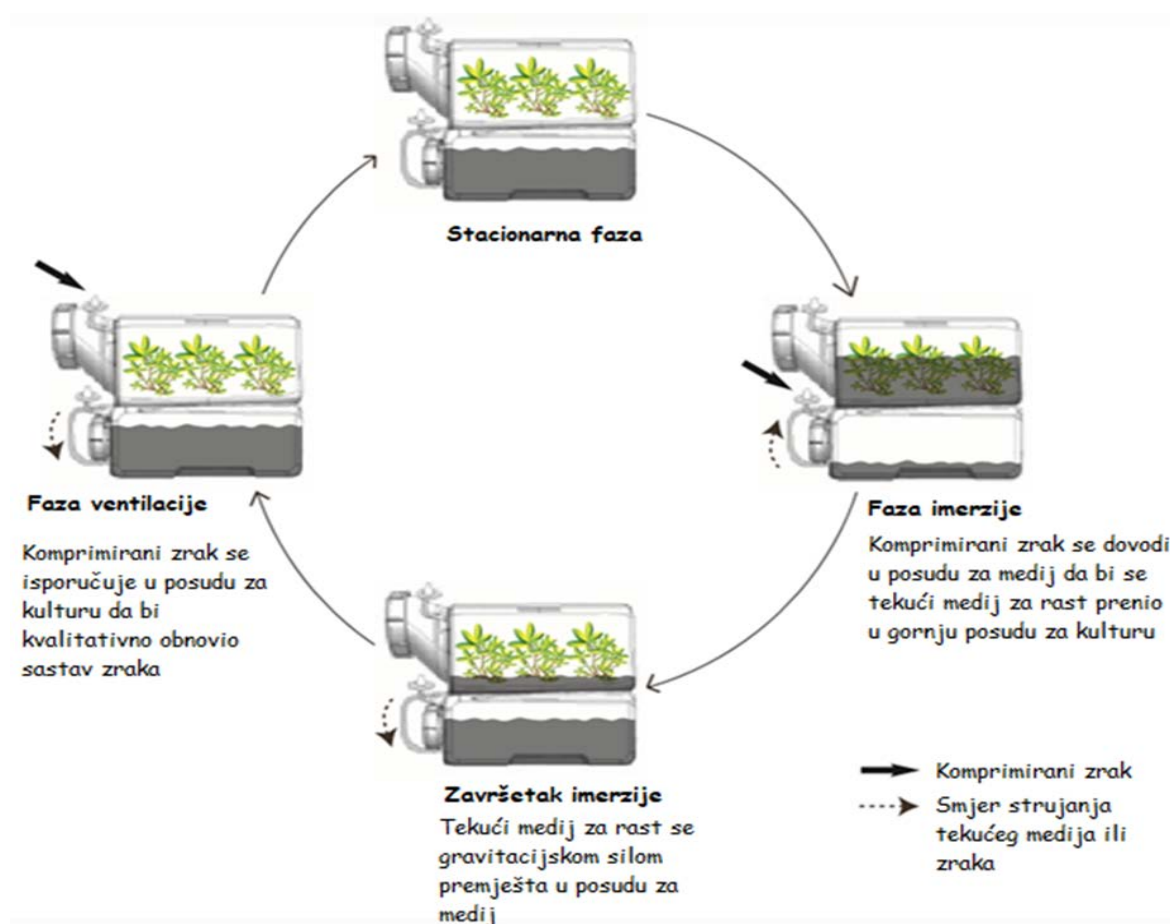
pratila i kontrolirala putem senzora za CO₂ (Metrel Multinorm + sonda Metrel CO₂ Probe A1180), (Slika 5.).



Slika 5. Tlačena boca s CO₂, uređaj za mjerenje koncentracije CO₂ i CPU sustav
(Foto: D. Bošnjak, 2021.)

2.2. SETIS™ imerzni sustav bioreaktora

Imerzni sustav bioreaktora SETIS™ se sastoji od fizički odvojenih posuda (komora) s biljnim materijalom i posuda s tekućim hranjivim medijem koji pomoću pneumatike i zadanog ciklusa povremeno potapa biljni materijal (Slika 4. i 6.). Svaka je jedinica (bioreaktor), opremljena dodatnim ventilima s mikrofilterima (veličina pora 0,2 μm) za regulaciju tlaka i izmjenu plinova čime se postiže kontrolirano prozračivanje medija i komore s biljnim materijalom kako bi se spriječila akumulacija etilena i naknadna kontaminacija u sustavu. Slični sustav koristi se i u humanoj medicini za uzgoj tkiva i/ili pojedinih organa za transplantaciju, a u farmaciji za proizvodnju sekundarnih metabolita i biomase. Jedna od važnih komponenti ovog sustava je računalna kontrolna upravljačka jedinica – CPU i pneumatska jedinica (kompresor). Pneumatska jedinica stvara vrlo čisti i ne kontaminirani suhi zrak. Veza između pneumatskih elemenata i upravljačke jedinice osigurava vrlo precizan i kontroliran rad bioreaktora. Pomoću kontrolne jedinice automatizira se sam proces i frekvencija te kontroliraju pojedine faze imerzije, ventilacije, primjena raznih plinova, rasvjete, pH, temperature, kao i optimizacija i smanjenje potrošnje zraka. Također se omogućuje stvaranje i spremanje vlastitih programa (setup) i sigurnosnih kopija, kao i internetski pristup samoj bazi.

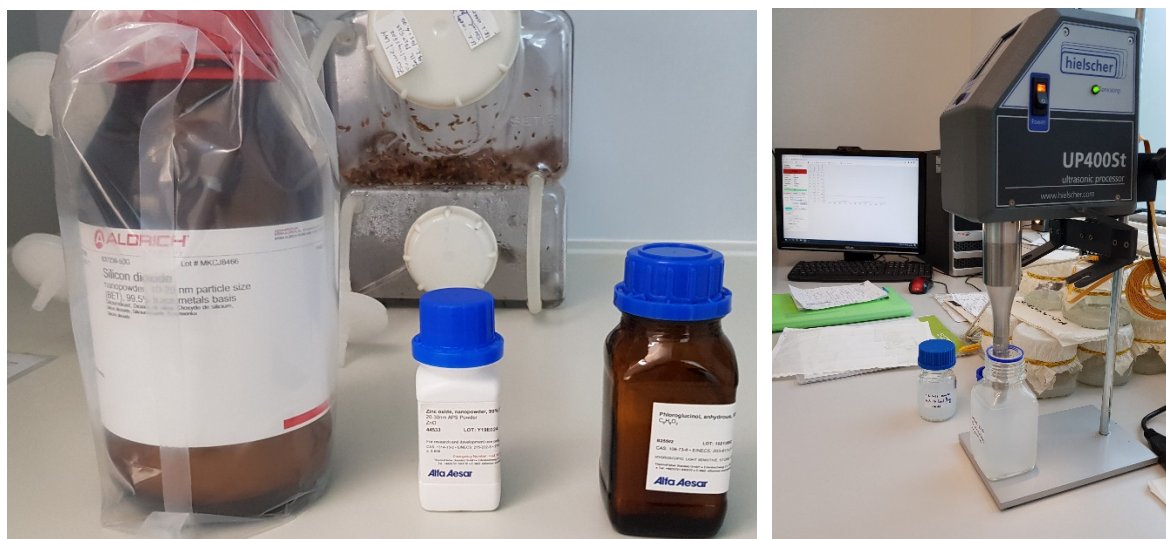


Slika 6. Princip rada SETIS™ sustava (Izvor: Stanisavljević i sur., 2018.)

2.3. Tretmani primijenjeni u istraživanju

Tretmani su uključivali primjenu industrijskih gotovih i sintetiziranih nanočestica silicijevog dioksida (nano-SiO₂, SiO₂ nanopuder, veličina čestica 10 – 20 nm, proizvođač: Sigma-Aldrich, CAS: 7631-86-9), nanočestica cinkovog oksida (nano-ZnO, ZnO nanopuder, veličina čestica 20 – 30 nm, proizvođač: Alfa Aesar, CAS: 1314-13-2) i floroglucinola (anhidrirani floroglucinol C₆H₆O₃, proizvođač: Alfa Aesar, CAS: 108-73-6) te kombinacije navedenih nanočestica s floroglucinolom.

Matične otopine nanočestica SiO₂ i ZnO pripremljene su otapanjem i disperzijom pomoću DMSO (dimetil sulfoksid, CAS: 67-68-5) i ultrazvučnog homogenizatora Hielcher UP400St (Slika 7.).



Slika 7. Nanočestice i floroglucinol, ultrazvučna disperzija (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

U istraživanju je postavljeno 10 tretmana i kontrolni tretman (11 tretmana). Svaki tretman postavljen je u 3 repeticije (3 bioreaktora + 11 tretmana = 33 bioreaktora), a svaka posuda s biljnim materijalom sadržavala je 200 eksplantata borovice (3 x 200 = 600 eksplantata po tretmanu). Tretmani su uključivali sljedeće koncentracije nano-SiO₂, nano-ZnO i floroglucinol, te njihove međusobne kombinacije (Tablica 2.):

Tablica 2. Tretmani u istraživanju

Šifra tretmana	Koncentracija – repeticije
K	kontrola – bez nanočestica i/ili floroglucinola – 3 repeticije
BI	30 mg/L – nano-SiO ₂ (10 – 20 nm) – 3 repeticije
BII	75 mg/L – nano-SiO ₂ (10 – 20 nm) – 3 repeticije
CI	1 mg/L – nano-ZnO (20 – 30 nm) – 3 repeticije
CII	10 mg/L – nano-ZnO (20 – 30 nm) – 3 repeticije
DI	40 mg/L – floroglucinol – 3 repeticije
DII	80 mg/L – floroglucinol – 3 repeticije
EI	30 mg/L nano-SiO ₂ (10 – 20 nm) + 40 mg/L floroglucinol – 3 repeticije
EII	75 mg/L nano-SiO ₂ (10 – 20 nm) + 40 mg/L floroglucinol – 3 repeticije
FI	1 mg/L nano-ZnO (20 – 30 nm) + 40 mg/L floroglucinol – 3 repeticije
FII	10 mg/L nano-ZnO (20 – 30 nm) + 40 mg/L floroglucinol – 3 repeticije

2.4. Uzorkovanje tekućeg hranjivog medija, biljnog materijala i priprema za analize

Uzorkovanje tekućeg hranjivog medija potrebnog za daljnje analize elemenata obavljeno je neposredno nakon autoklaviranja (start, 0 dana), zatim nakon 15 dana i na kraju ciklusa nakon 40 dana (ukupno 3 uzorkovanja). Po svakom uzorkovanju mjerena je pH (EN13037/2011) i EC vrijednost (elektrokonduktivitet tekućeg hranjivog medija; EN13038/2011) te analizirana koncentracija hranjivih elemenata u mediju (mineralni sastav hranjivog medija, mikro i makro elementi).

Nakon 40 dana kulture biljke su dostigle željenu biomasu potrebnu za fazu multiplikacije, odnosno uzorkovanja. Uzorkovane su cijele biljke borovnice (biljka s izdancima) te su obavljena mjerenja morfoloških pokazatelja rasta i razvoja (suha tvar, visina i broj izdanaka, multiplikacija, broj nodija i listova, dužina internodija) na 100 nasumično odabranih biljaka.

Biljni materijal potreban za ostale analize mineralnog sastava je odvagano, odložen u papirnate vrećice s pripadajućim laboratorijskim brojem i stavljen u sušionik na sušenje. Biljni materijal sušen je pola sata na 105 °C te zatim na temperaturi od 70 °C do konstantne mase, nakon čega je izvršeno vaganje suhe mase te je određena specifična masa suhe tvari (%; EN13040/2007). Osušena biljna masa samljevena je na HMF (engl. *heavy metal free*) mlinu i spremljena u papirnate vrećice za daljnje elementarne analize. Dio biljnog materijala potreban za fiziološko-biokemijske analize odvagano je u svježem stanju te obrađen u istom danu prema uputama pojedinih protokola.

2.5. Vizualna opažanja i indeks vitrifikacije

Nakon 40 dana kulture (kraj ciklusa) obavljena su vizualna opažanja te evaluacija biljnog materijala i hranjivog medija.

Evaluacija razine vitrifikacije (indeks vitrifikacije) provedena je prema metodi **Tian i sur. (2015.)** na osnovu vizualnih opažanja koristeći skalu ocjena od 0 do 4 (Slika 8.) sa sljedećim karakteristikama: 0 – izdanak na kojem nema uočenih simptoma vitrifikacije, 1 – dio izdanka s blago transparentnim i staklastim listovima, 2 – cijeli izdanak sa srednje transparentnim i staklastim listovima; 3 – izrazito staklast i transparentan cijeli izdanak s listovima; 4 – cijeli izdanak naboran, izvijen, lomljiv, retardiran u rastu i bez funkcije. Prilikom vizualne evaluacije svi izdanci koji su pripadali 1 do 4 razini uvršteni su u formulu za izračun indeksa vitrifikacije kao vitrificirani izdanci.

Indeks (frekvencija) vitrifikacije izdanaka izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\text{Indeks vitrifikacije (\%)} = \frac{\text{vitrificirani izdanci}}{\text{ukupan broj promatranih izdanaka}} \times 100$$



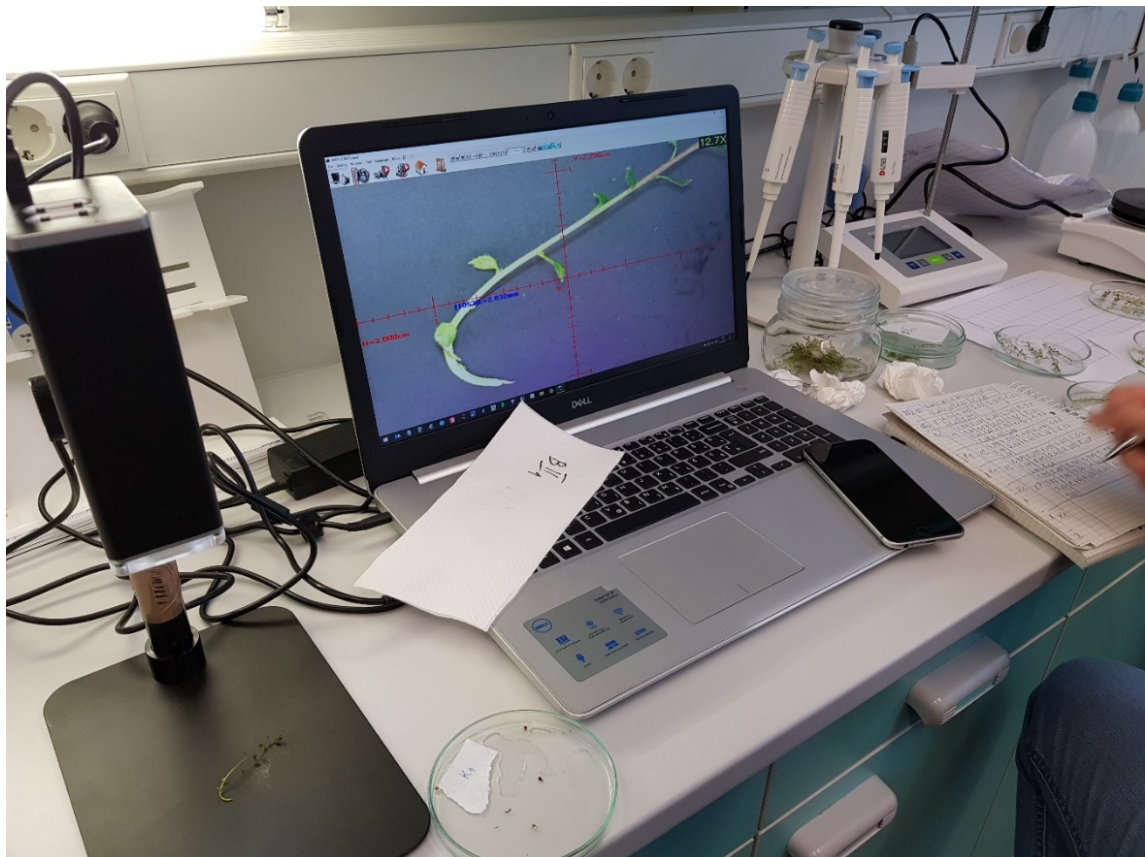
Slika 8. Morfološke značajke vitrificiranih izdanaka borovnice *in vitro* prema razinama vitrifikacije. a – normalni izdanak, stupanj vitrifikacije 0; b – blago vitrificirani izdanak, razina vitrifikacije 1; c – srednje vitrificirani izdanak, razina vitrifikacije 2; d – jako vitrificirani izdanci, razina vitrifikacije 3; e – izrazito vitrificirani izdanak, bez funkcije, razina vitrifikacije 4. (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

2.6. Mjerenje rasta i razvoja – biljni morfološki pokazatelji

Nakon 40 dana kulture pristupilo se određivanju biljnih morfoloških pokazatelja: suhe tvari, veličine i broja izdanaka, multiplikacije, broja nodija i listova te dužine internodija. Mjerenje je obavljeno u laboratoriju za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih

znanosti Osijek. Pojedinačne biljke su pažljivo prenesene na bijelu podlogu gdje je obavljena disekcija i odvajanje izdanaka od kalusa (baze biljke). Nakon toga je izvršeno brojanje izdanaka i listova, određivanje multiplikacije te mjerenje veličine izdanaka uz pomoć ravnala. Kako su internodiji i nodiji na izdancima borovnice vrlo sitni i ne mogu se izmjeriti prostim okom isti su izmjereni pomoću ViTiny UM12 Long Working Distance 5MP USB digitalnog mikroskopa. Mikroskop posjeduje i licencirani UM12 Application software pomoću kojeg su izvršena direktna mjerenja na slikama (Slika 9.).

Sadržaj suhe tvari (%) određen je sušenjem 100g ($\pm 0,001$ g) svježeg uzorka, odvagano u aluminijske lađice. Uzorak je sušen u sušioniku na 103 ± 2 °C do konstantne mase. Postotak vlage izračunat je iz odvaga svježe i suhe tvari nakon sušenja i izražen u g suhe tvari po kilogramu svježe tvari te preračunat u postotak (**EN 13040:1999**).



Slika 9. Mjerenje morfoloških parametara izdanaka borovnice (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

2.7. Analiza anatomije listova

Proučene su anatomske značajke lista, odnosno izgled epiderme i parenhima lista te veličina, broj i izgled puči.

Vizualna analiza epiderme i parenhima lista provedena je na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Listovi borovnice su uklopljeni u 6%-tnoj otopini glutaraldehida (Grade II, Sigma) u fosfatnom puferu koji je sadržavao natrijev dihidrogen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 7,64 g/L i dinatrijev hidrogen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 8,899 g/L pomiješane u jednakom omjeru (v/v). Uzorci su dehidrirani u seriji alkohola prema sljedećem protokolu u tablici 3.

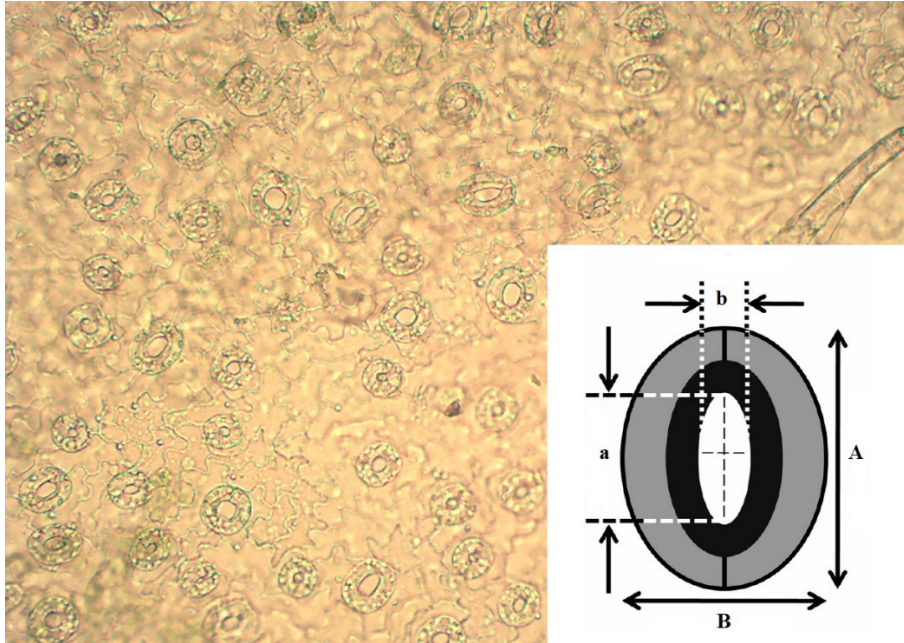
Tablica 3. Postupak dehidracije biljnog materijala

Alkohol	Vrijeme
100% 2-metoksietanol	2 x 2 sata
96 % etanol	2 x 1 sat
100 % n-propanol	2 x 1 sat
100 % n-butanol	2 x 1 sat

Uzorci su nakon dehidracije uklopljeni u termoplastičnu smolu (Leica Historesin Embedding Kit), izvađeni iz kapsulica otapanjem u vodi, zalijepljeni na drvene blokiće (2 x 2 cm) super ljepilom i ostavljeni na sušenju preko noći. Uzorci su rezani staklenim nožem na debljinu od 3 μm pomoću rotacionog mikrotoma Leica RM2155. Analiza kutikule i parenhima obavljena je pomoću svjetlosnog mikroskopa i digitalne mikroskopske kamere Moticam 350 pri povećanju od 120x i programa Motic Images Plus 2.0ML.

Analiza puči provedena je na Zavodu za ekologiju voda Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Puči su pripremljene za analizu prema metodi opisanoj u **Gao i sur. (2017.)**. Iz svakog tretmana i repeticije uzeto je 10 nasumično odabranih biljaka borovnice. Sa svake je biljke uzeto najmanje 10 listova koji su nakon disekcije potopljeni u MES-KCl pufer te im je pomoću skalpela i pincete oguljena donja epiderma. Dijelovi epiderme su promatrani pod svjetlosnim mikroskopom (Jenaval, Carl Zeiss) i fotografirani digitalnom mikroskopskom kamerom Moticam 350 pri povećanju od

25x te analizirani u programu Motic Images Plus 2.0ML (Motic China Group). Analiza je obuhvaćala određivanje broja puči po površini epiderme lista, mjerenje dimenzija puči (dužina (A) i širina (B) puči, dužina (a) i otvor (b) porusa, Slika 10) na 150 nasumično odabranih puči po tretmanu i repeticiji (ukupno 4 950 puči).



Slika 10. Mjerenje dimenzija puči - dužina (A) i širina (B) puči, dužina (a) i otvor (b) porusa, (Foto: D. Bošnjak, 2021., shema prilagođena prema Savvides i sur., 2012.)

2.8. Analiza mineralnog sastava medija i biljnog tkiva borovnice

Laboratorijske analize mineralnog sastava tekućeg hranjivog medija i biljnog materijala (mikro- i makro- elementi) provedene su u Centralnom laboratoriju Zavoda za agroekologiju i zaštitu okoliša na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. Mineralni sastav tekućeg hranjivog medija i razorenog biljnog materijala analiziran je na uređajima PerkinElmer ICP-OES Optima 2100DV i Skalar CFA San (modul za određivanje nitratnog i amonijskog oblika dušika). Uslijed prevelike zasićenosti hranjivog medija s elementima isti su se morali razrijediti ultračistom vodom 100 puta, dok su uzorci biljnog materijala (0,25 g) odvagani analitičkom vagom u teflonske kivete za digestiju i digestirani sa 6 ml 65 % HNO_3 (Fisher) i 2 ml 30 % H_2O_2 (Fisher) u mikrovalnoj pećnici CEM Mars 6 (mokri postupak). Nakon postupka digestije, ohlađena otopina je kvantitativno prenesena u tube (kivete) za centrifugiranje od 50 ml (Sarstedt) te nadopunjena do oznake s ultračistom vodom.

Mjerenje koncentracije elemenata kalcija (Ca), magnezija (Mg), kalija (K), natrija (Na), bakra (Cu), željeza (Fe), mangana (Mn), cinka (Zn), molibdena (Mo), silicija (Si), fosfora (P), sumpora (S) i bora (B) obavljeno je direktno u razrijeđenom digestatu uzorka na uređaju PerkinElmer ICP-OES Optima 2100DV, dok je mjerenje koncentracija nitrata i amonijaka (NO_3^- i NH_4^+) obavljeno na uređaju Skalar CFA San. Koncentracije su izražene u mg kg^{-1} biljnog tkiva i/ili mg l^{-1} hranjivog medija.

Tijekom mjerenja koncentracije mineralnih elemenata unutra hranjivog medija utvrđena je kontaminacija uzoraka pojedinim građevnim elementima bioreaktora (posude za biljni materijal i tekući hranjivi medije, sterilna silikonska crijeva). U cilju korekcije i točnosti rezultata te determinacije otpuštanja, odnosno kontaminacije tretmana pojedinim mineralnim elementima iz samog sustava bioreaktora postavljen je dodatni tretman 0 (nula) koji je sadržavao identični volumen ultračiste vode (0,75 L, Milli-Q[®] Direct, Merck) u posudi za hranjivi medij, dok je posuda s biljnim materijalom bila prazna. Na ovom tretmanu pristupilo se analizi svih promatranih parametara tekućeg hranjivog medija kao i za sve ostale tretmane u istraživanju nakon autoklaviranja, te nakon 15 i 40 dana.

2.9. Mjerenje pH i EC vrijednosti tekućeg hranjivog medija

pH i EC vrijednost hranjivog medija određena je neposredno nakon uzorkovanja (start 0-ti dana, nakon 15 dana i nakon 40 dana) u laboratoriju za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. pH vrijednost mjerena je pH metrom (Mettler Toledo FiveEasy FP20) direktno u uzorku u sterilnim kivetama s ravnim dnom volumena 50 ml. pH vrijednost očitava se i zabilježi nakon stabilizacije vrijednosti (promjena vrijednosti manja od 0,1 pH jedinice tijekom 15 s) (EN 13037:2011). EC vrijednost je također mjerna direktno u uzorku konduktometrom (WTW Multi 3410). Rezultati EC u mS/cm^{-1} zabilježeni su nakon stabilizacije vrijednosti (EN 13038:2011).

2.10. Analize fiziološko-biokemijskih pokazatelja reakcije biljaka na primijenjene tretmane i uzgojne uvjete

Laboratorijske analize fiziološko-biokemijskih pokazatelja reakcije biljaka na primijenjene tretmane i uzgojne uvjete provedene su na Odjelu za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Provedene su sljedeće analize:

- **Određivanje koncentracije klorofila a i klorofila b** – za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata biljno tkivo je smrznuto u tekućem dušiku uz dodatak magnezijevog hidrogenkarbonata (MgHCO_3) i usitnjeno u homogenizatoru te je oko 0,1 g uzorka prebačeno u plastične kivete od 2 ml. Pigmenti su ekstrahirani u 1 ml hladnog acetona, 15 minuta na ledu nakon čega su ekstrakti centrifugirani 10 minuta pri 18 000 g i temperaturi 4 °C. Supernatant je dekantiran u plastičnu epruvetu s čepom na navoj, a na talog je ponovno dodano 1 ml acetona. Postupak reekstrakcije ponovljen je pet puta, do potpunog obezbojenja tkiva u talogu. Volumen spojenih supernatanata izmjeren je menzurom, ekstrakt je potom pretočen u staklenu kivetu te je spektrofotometrijski određena apsorbancija pri valnim duljinama od 644,8 i 661,6 nm (UV-Vis spektroskopija, Shimadzu UV-1800). Koncentracija klorofila a (Chl a), klorofila b (Chl b) izračunata je uz korištenje ekstinkcijskih koeficijenata prema **Lichtenthaler (1987.)** i izražena je u mg g^{-1} svježe tvari.
- **Određivanje koncentracije ukupnih karotenoida** – koncentracija ukupnih karotenoida (Car) određena je iz ekstrakta za mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata dobivenih prethodno opisanim postupkom. Koncentracija karotenoida određena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama 470, 644,8 i 661,6 nm (UV-Vis spektroskopija, Shimadzu UV-1800) i izračunata uz korištenje ekstinkcijskih koeficijenata prema **Lichtenthaler (1987.)**, te je izražena u mg g^{-1} svježe tvari.
- **Određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti** – za analizu ukupne antioksidacijske aktivnosti (UAA), oko 0,1 g usitnjenog biljnog praha borovnice (prah dobiven kao i za potrebe analize pigmenata klorofila) odvagano je u prethodno izvaganu i označenu kivetu. U kivetu je dodan 1 ml 80 %-tnog etanola i ekstrakcija se provodila 24 h pri -20 °C. Nakon centrifugiranja (10 min pri 15 000 g i 4 °C) dobiveni supernatant odvojen je u čistu kivetu. Isti supernatant se koristio za određivanje ukupnih topljivih fenola. UAA određena je metodom opisanom u **Brand-Williams i sur., (1995.)**. Reakcija je započela miješanjem 20 μl dobivenog etanolnog ekstrakta i 980 μl 0,094 mM otopine 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u čvrsto zatvorenim kivetama u tami uz lagano miješanje pri 20 °C u trajanju od 15 minuta. Po završetku reakcije izmjerena je apsorbancija otopine pri valnoj duljini od 515 nm (UV-Vis spektroskopija, Shimadzu UV-1800). UAA uzorka određena je iz standardne krivulje apsorbancije otopina poznate koncentracije Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) i izražena u mikrogramima ekvivalenta Troloxa g^{-1} svježe tvari.

- **Određivanje koncentracije ukupnih topljivih fenola** – iz etanolnih ekstrakata dobivenih za određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti određena je koncentracija ukupnih topljivih fenola (PHE) spektrofotometrijski metodom po Folin-Ciocalteu (**Singleton i Rossi, 1965.**). Metoda se temelji na reakciji Folin-Ciocalteu (FC) reagensa (kompleks fosfomolibdenske-fosfovolframske kiseline) i reducirajućeg reagensa (fenolni spoj) pri čemu dolazi do pojave plavog obojenja. U kivetu je dodano 20 μ l alkoholnog ekstrakta tkiva, 1580 μ L vode i 100 μ l FC reagensa te pomiješano na vrtložnoj miješalici. Nakon inkubacije do najviše 8 min u reakcijsku smjesu dodano je 300 μ l zasićene otopine Na_2CO_3 . Uzorci su zatim inkubirani 60 min pri 37 °C u vodenoj kupelji. Apsorbancija uzoraka mjerena je pri 765 nm (UV-Vis spektroskopija, Shimadzu UV-1800). Koncentracija ukupnih topljivih fenola određena je iz baždarne krivulje za koju je kao standard korištena galna kiselina (GA). Koncentracija ukupnih topljivih PHE spojeva u biljnom tkivu izražena je u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po gramu svježe tvari.
- **Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije** – koncentracija produkata lipidne peroksidacije (LPO) određena je metodom prema **Verma i Dubey (2003.)** kao koncentracija supstanci koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid reactive substances* –TBARS). Izdanci borovnice su smrznuti u tekućem dušiku i usitnjeni do finog praha u homogenizatoru. Oko 0,2 g usitnjenog tkiva ekstrahirano je s 1 ml 0,1 %-tne trikloroctene kiseline (TCA). Nakon centrifugiranja pri 6 000 g i 4 °C u trajanju od 5 min odvojeno je 0,5 ml supernatanta i pomiješano s 1 ml 0,5 %-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20 %-tnoj TCA. Tako dobivena smjesa zagrijavana je 30 min u vodenoj kupelji na 95 °C kako bi došlo do raspada lipidnih peroksida i nastanka produkata koji reagiraju s TBA. Nakon hlađenja na ledu uzorci su centrifugirani pri 18000 g i 4 °C tijekom 15 min. Supernatant je korišten za spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije pri valnim duljinama od 532 i 600 nm (UV-Vis spektroskopija, Shimadzu UV-1800). Kao slijepa proba korištena je otopina 0,5 % TBA u 20 % TCA. Koncentracija produkata LPO izračunata je korištenjem molarnog ekstinkcijskog faktora $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i izražena u nmol g^{-1} svježe tvari.
- **Određivanje koncentracije askorbinske kiseline** – koncentracija askorbinske kiseline (AA) u izdancima borovnice određena je prema **Bendritter i sur. (1998.)**. Oko 0,2 g fino usitnjenog praha odvagano je u plastične epruvete od 2 mL. U kivetu je dodano 1 ml dH_2O te se ekstrakcija provodila na ledu 15 min. Homogenati su centrifugirani na 3 000 g 15 min pri 4 °C. Dobiveni vodeni ekstrakt korišten je za određivanje koncentracije

AA. U reakcijsku smjesu koja se sastojala od 300 μL vodenog ekstrakta, 100 μL 13,3 % trikloroetene kiseline i 25 μL deionizirane vode dodano je 75 μL 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) reagensa (2 g DNPH, 230 mg tiouree i 270 mg CuSO_4 u 100 mL 5M H_2SO_4). Slijepe probe napravljene su paralelno za svaki uzorak na isti način, osim dodatka DNPH reagensa koji je dodan naknadno, nakon inkubacije. Dobivene reakcijske smjese inkubirane su u vodenoj kupelji 1 h na 37 °C. Nakon inkubacije i dodavanja DNPH reagensa u slijepe probe, u sve reakcijske smjese dodano je po 500 μL 65 % H_2SO_4 . Apsorbancija tako dobivenih reakcijskih smjesa mjerena je na 520 nm (UV-Vis spektroskopija, Shimadzu UV-1800) te je koncentracija AA dobivena ekstrapolacijom iz baždarne krivulje s poznatim koncentracijama AA (2,5 - 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Konačan sadržaj AA izražen je u mg/100 g svježe tvari.

2.11. Statistička obrada podataka

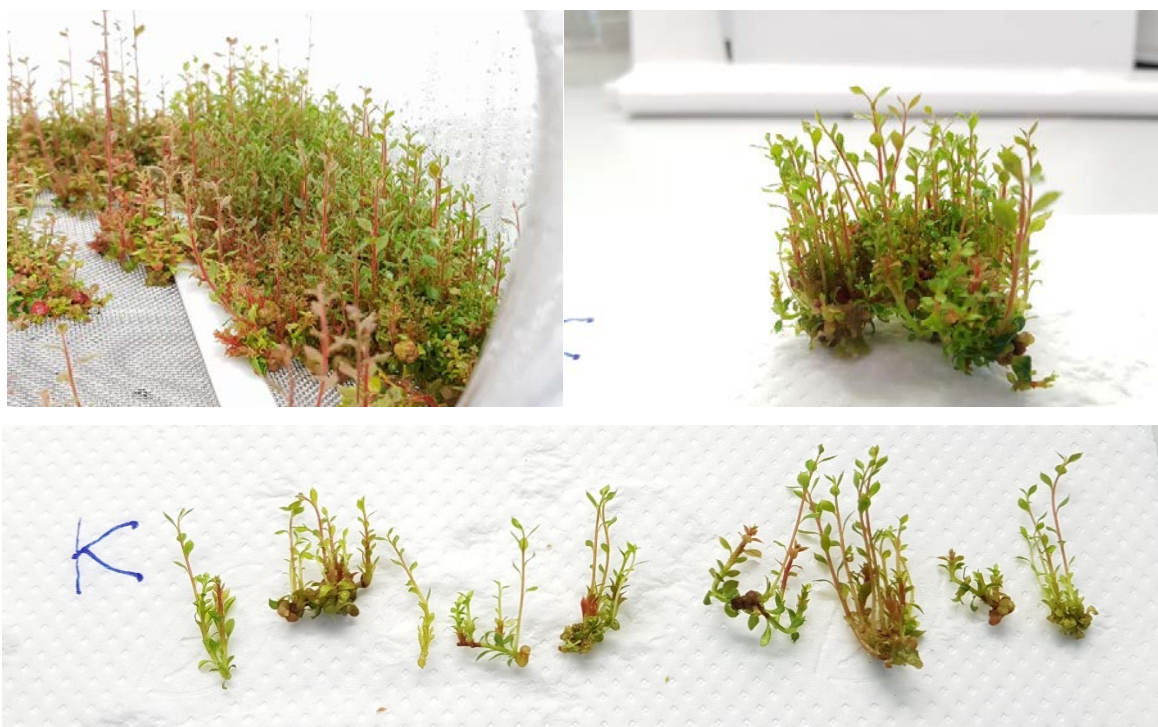
Prikupljeni podatci analizirani su pomoću Microsoft Office Excel 2013, SAS Software 9.3., programske podrške (2002.-2010., SAS Institute Inc., Cary, USA). Od statističkih metoda korištena je faktorijalna ANOVA, a razlike između srednjih vrijednosti primijenjenih tretmana ispitane su Fisherovim LSD testom (engl. *Least Significant Difference*) na razini značajnosti od $p \leq 0,05$. Također, obavljena je analiza korelacije kako bi se utvrdila povezanost i međusobna ovisnost pojedinih analiziranih pokazatelja.

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

3.1. Vizualna opažanja i indeks vitrifikacije

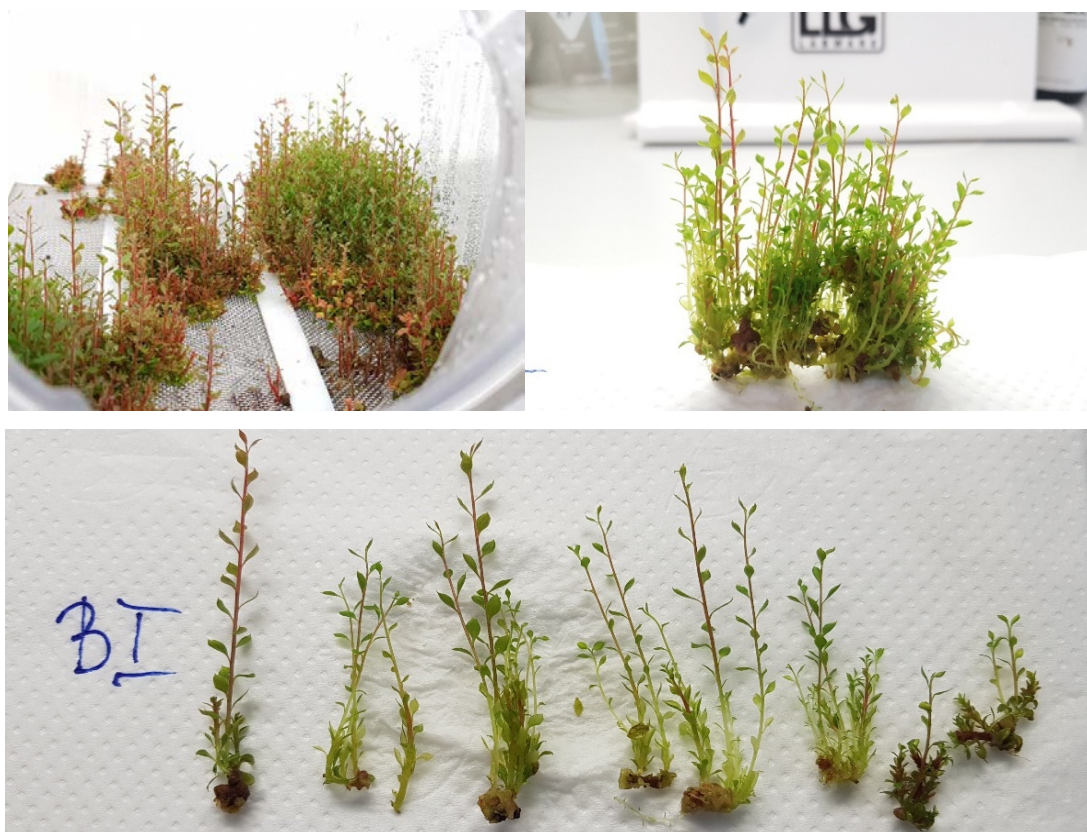
Nakon 40 dana kulture kod svih primijenjenih tretmana dobivena je dostatna biomasa potrebna za vizualnu evaluaciju tretmana i provedbu potrebnih analiza. Hranjivi medij na svim tretmanima bio je bez znakova kontaminacija te bistar s vidljivim primjesama biljnog tkiva. Kod svih tretmana s floroglucinolom (DI, DII, EI, EI, FI i FII) zapažena je pojava žućkaste boje hranjivog medija bez štetnog učinka, kao posljedica primijene samog floroglucinola.

Kod kontrolnog tretmana (K) biljke su imale uspravne izdanke, veličine 1 do 4 cm, a prevladavali su kratki, nabubreni i naborani vitrificirani izdanci veličine 3 cm, crvenkaste boje sa zelenim listićima. Indeks vitrifikacije iznosio je 40 % (Slika 11.).

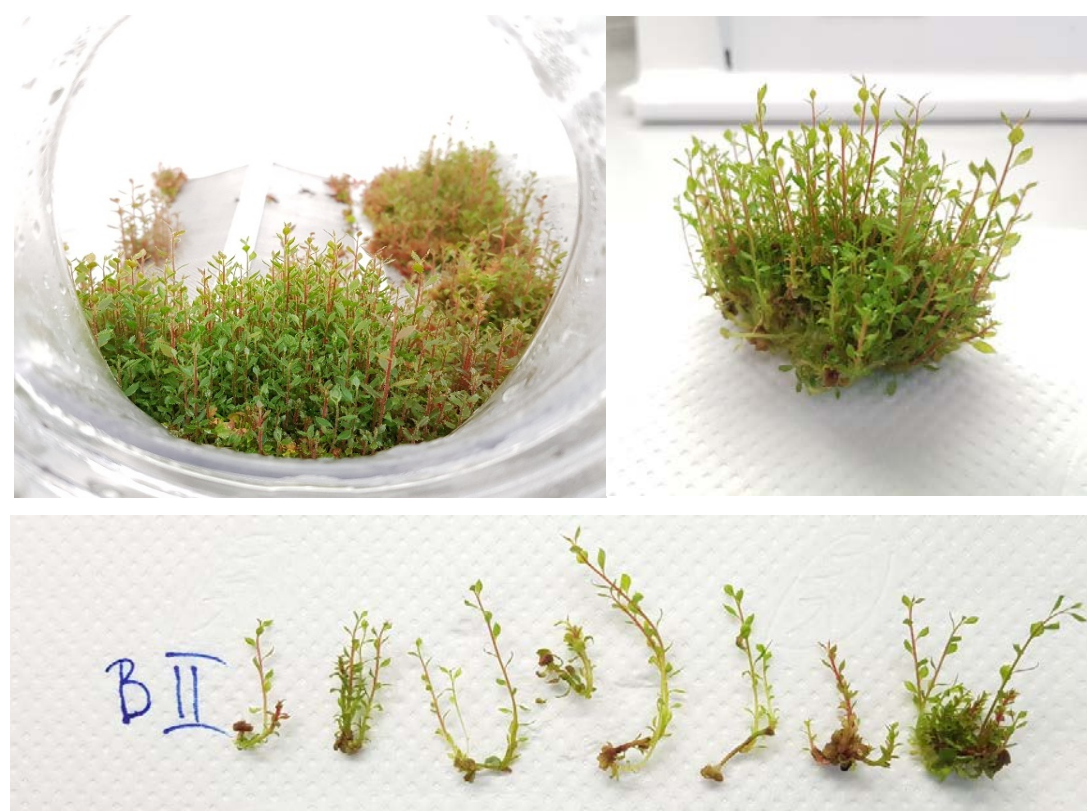


Slika 11. Vizualne karakteristike kontrolnog (K) tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Tretman BI koji je uključivao nižu koncentraciju nano-SiO₂ (30 mg/L) rezultirao je robusim izdancima (karakterizirao ih je jak vigor) zelenkasto crvene boje, veličine 1 do 6 cm, a prevladavali su izdanci veličine 4 cm. Indeks vitrifikacije iznosio je 20 % (Slika 12.).

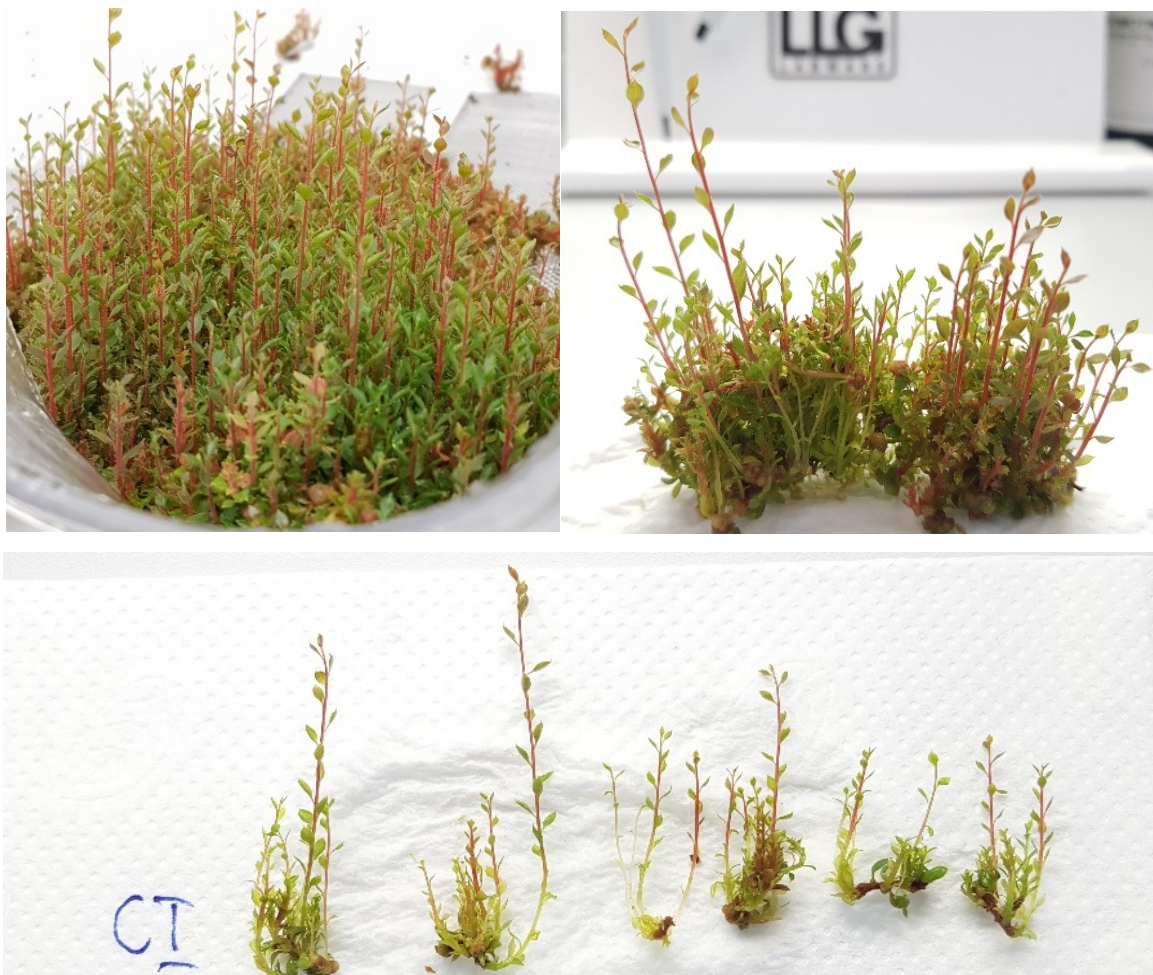


Slika 12. Vizualne karakteristike BI tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)



Slika 13. Vizualne karakteristike BII tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

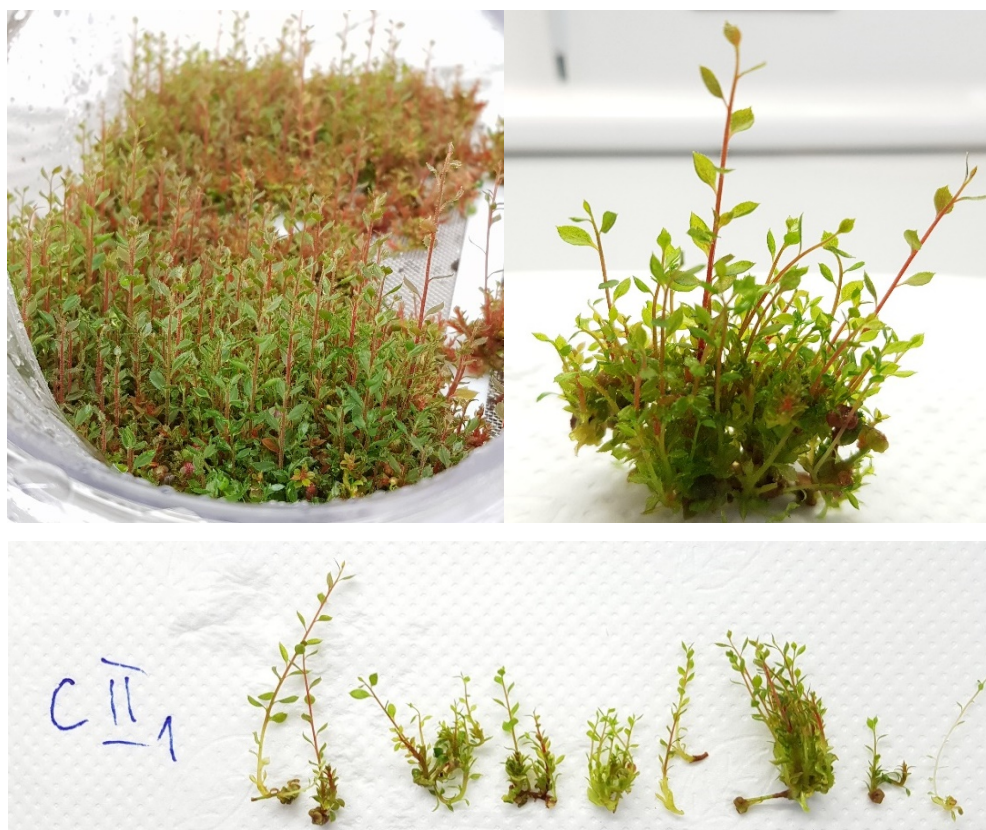
Kod tretmana s višom koncentracijom nano-SiO₂ (75 mg/L, BII) veličina izdanaka kretala se u rasponu od 1 do 5 cm, a prevladavali su izdanci veličine 3 cm, zelenkasto crvene boje s indeksom vitrifikacije od 20 % (Slika 13.).



Slika 14. Vizualne karakteristike CI tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Kod tretmana CI koji je uključivao primjenu niže koncentracije nano-ZnO (1 mg/L) izdanci su bili više crvenkaste boje u odnosu na prethodno opisane tretmane BI i BII (zelenkasto crveni), veličine 1 do 6 cm, a prevladavali su kratki, nabubreni i naborani vitrificirani izdanci veličine 4 cm. Indeks vitrifikacije iznosio je 30 % (Slika 14.).

Kod tretmana s višom koncentracijom nano-ZnO od 10 mg/L (CII) među izdancima veličine 1 do 5 cm prevladavali su oni veličine 3 cm, zelenkasto crvene boje s indeksom vitrifikacije od 30 % (Slika 15.).

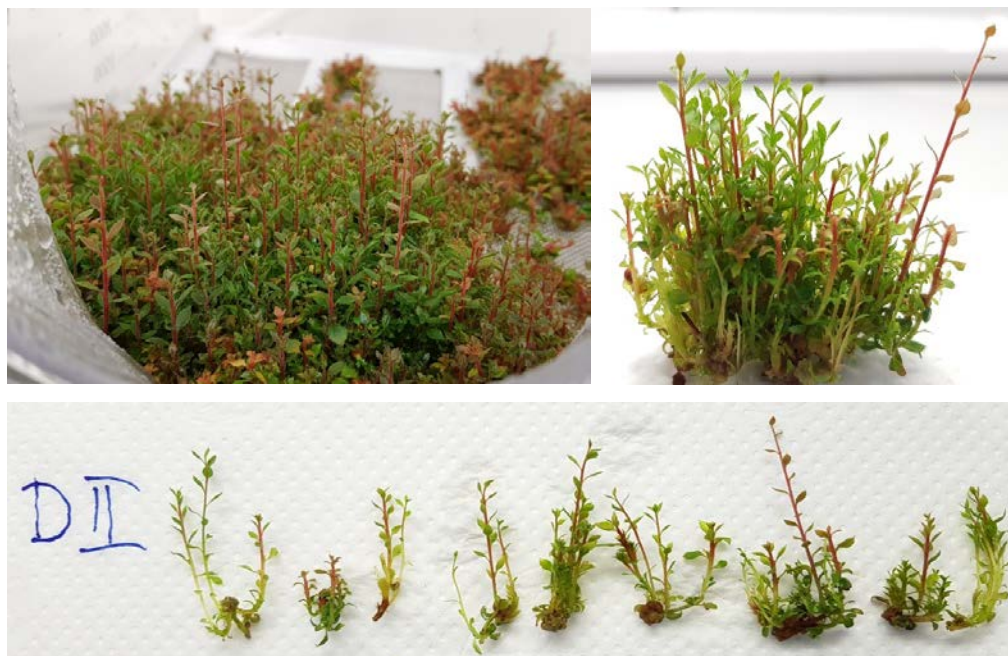


Slika 15. Vizualne karakteristike CII tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)



Slika 16. Vizualne karakteristike DI tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Tretman nižom koncentracijom floroglucinola (40 mg/L, DI) rezultirao je izdancima veličine u rasponu od 1 do 6 cm, a prevladavali su intenzivno vitrificirani kratki i nabubreni izdanci veličine 4 cm, robusnog izgleda i zelenkasto crvene boje. Indeks vitrifikacije iznosio je 30 % (Slika 16.).

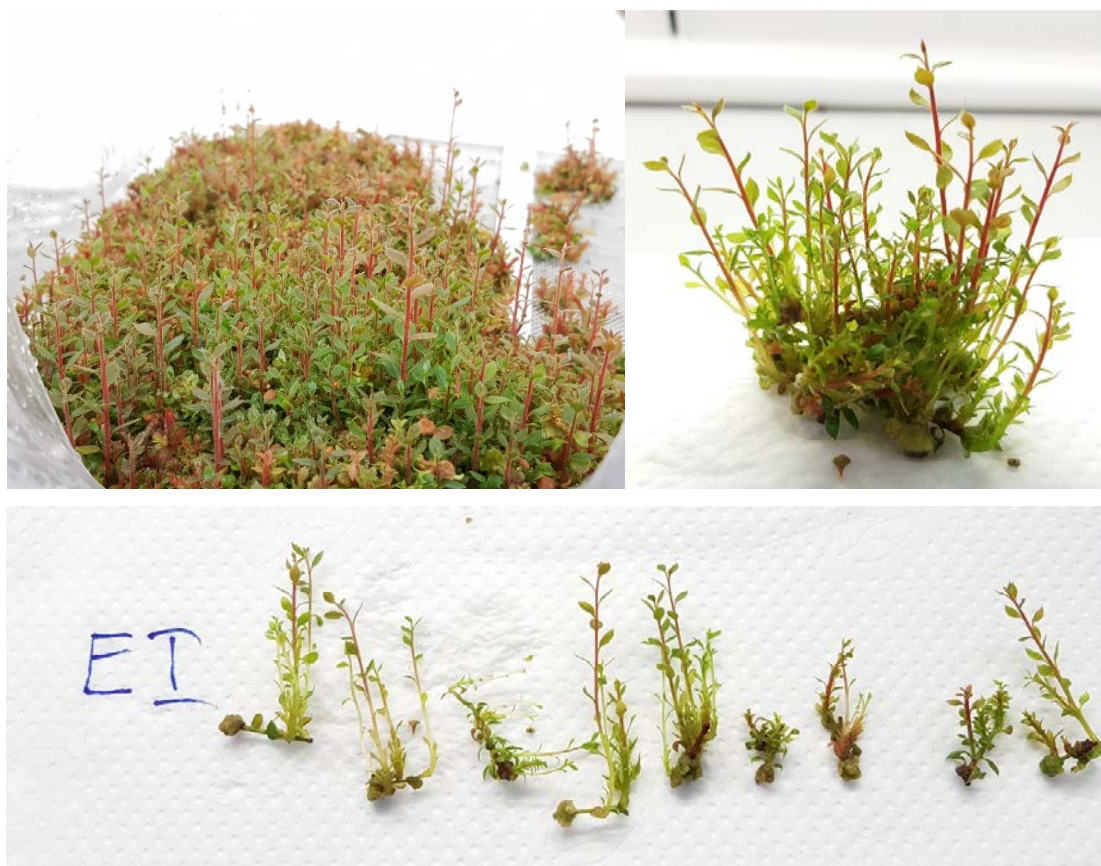


Slika 17. Vizualne karakteristike DII tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Tretman višom koncentracijom floroglucinola (80 mg/L, DII) po pitanju vitrifikacije izdanaka bio je dosta lošiji od prethodnog DI tretmana (niža koncentracija floroglucinola 40 mg/L). Izdanci su bili veličine 1 do 5 cm, a prevladavali su kratki vitrificirani izdanci veličine 3 cm, zelenkasto crvene boje s indeksom vitrifikacije od 40 % (Slika 17.).

Tretman EI koji je uključivao kombinaciju niže koncentracije nano-SiO₂ (30 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L) također je bio vizualno dosta vitrificiran. Izdanci su bili veličine 1 do 5 cm, a prevladavali su izdanci veličine od 2 do 3 cm s dosta izraženom crvenkastom bojom. Indeks vitrifikacije iznosio je 40 % (Slika 18.).

Tretman EII s kombinacijom više koncentracije nano-SiO₂ (75 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L) rezultirao je vrlo sličnim morfološkim karakteristikama kao i prethodni tretman EI. Izdanci su bili veličine 1 do 5 cm, a prevladavali su izdanci veličine od 2 do 3 cm s izraženom crvenkastom bojom. Indeks vitrifikacije iznosio je 40 % (Slika 19.).

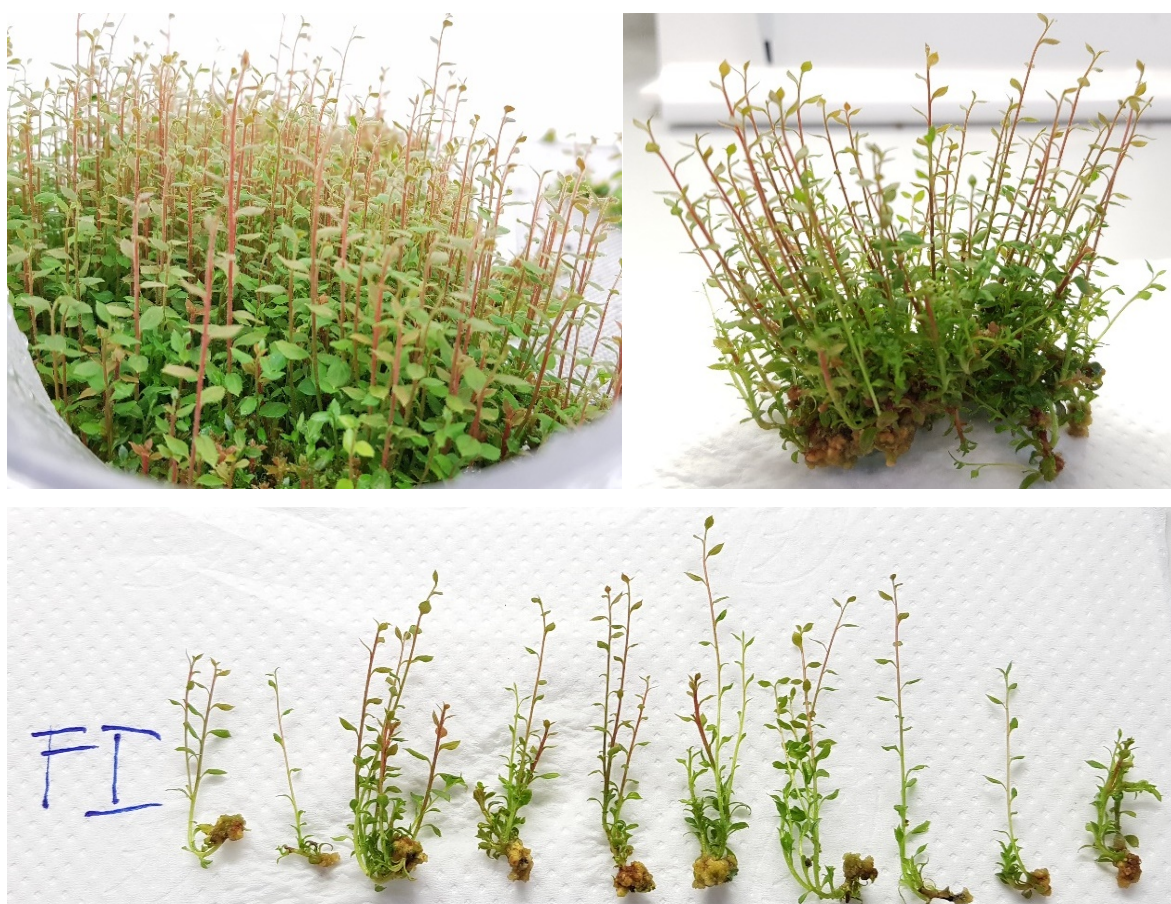


Slika 18. Vizualne karakteristike EI tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)



Slika 19. Vizualne karakteristike EII tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Kod tretmana FI s kombinacijom niže koncentracije nano-ZnO (1 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L) biljni materijal imao je vrlo robustan izgled (slično kao kod tretmana DI) s vrlo visokim izdancima, zelenkasto crvene boje čija se visina kretala u rasponu od 1 do 7 cm. Kod ovog tretmana prevladavali su izdanci veličine 5 cm. Vitifikacija je bila minimalna samo pri bazi izdanka u zoni vlaženja i imerzije. Indeks vitifikacije iznosio je 10 % (Slika 20.).



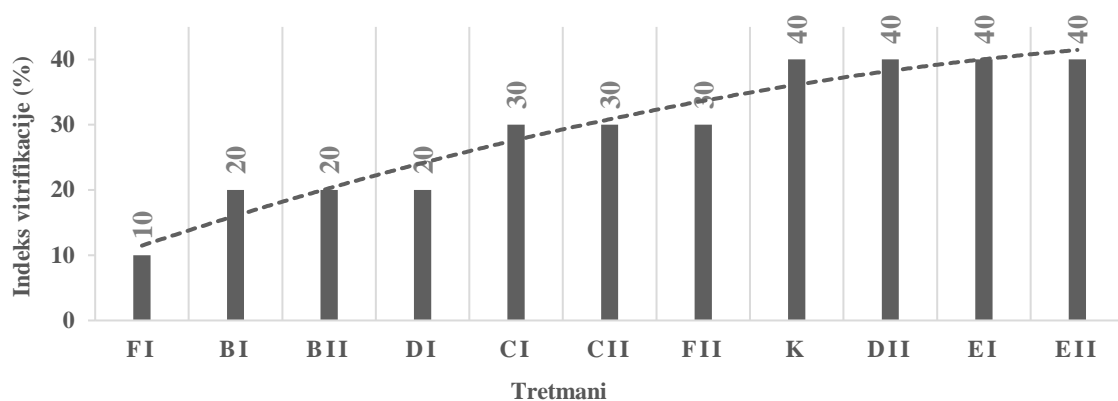
Slika 20. Vizualne karakteristike FI tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Tretman FII koji je uključivao kombinaciju više koncentracije nano-ZnO (10 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L) rezultirao je s izdancima koji su bili zelenkasto crvene boje, veličine 1 do 5 cm. Uočena je prisutnost vitificiranih kratkih izdanaka, zadebljanih pri bazi, a indeks vitifikacije iznosio je 30 % (Slika 21.).



Slika 21. Vizualne karakteristike FII tretmana (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Indeks vitrifikacije s vrijednošću od 40 % zabilježen je kod kontrolnog tretmana (K), tretmana višom koncentracijom floroglucinola 80 mg/L (DII) te kod tretmana kombinacije nano-SiO₂ (30 i 75 mg/L) i 40 mg/L floroglucinola (EI i EII) (Grafikon 1.). Indeks vitrifikacije od 30 % zabilježen je nakon tretmana s obje koncentracije nano-ZnO (CI i CII) te tretmana s kombinacijom floroglucinola (40 mg/L) i više koncentracije nano-ZnO (FII). Vrijednost indeksa vitrifikacije od 20 % utvrđena je kod oba tretmanima s nano-SiO₂ (BI i BII) te kod primjene niže koncentracije floroglucinola (40 mg/L, DI). Najniži indeks vitrifikacije (10 %) zabilježen je kod izdanaka vitrificiranih samo pri bazi, u zoni vlaženja i imerzije, nakon tretmana FI koji je uključivao kombinaciju niže koncentracije nano-ZnO (1 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L).



Grafikon 1. Indeks vitrifikacije (%) po primijenjenim tretmanima (vizualna opažanja)

3.2. Morfološki pokazatelji rasta i razvoja

Biljni morfološki pokazatelji rasta i razvoja praćeni u istraživanju su: visina izdanaka, broj izdanaka, stopa multiplikacije izdanaka (po izdanku i broju izdanaka), broj nodija, broj listova i dužina internodija na izdancima te suha tvar.

Tablica 4. Razlike u visini, broju i multiplikaciji izdanaka između primijenjenih tretmana

<i>Tretman</i>	Visina izdanaka (cm)	Broj izdanaka	Multiplikacija po izdanku	Multiplikacija po broju izdanaka
<i>Kontrola</i>	2,88 ± 0,83 ^{BC}	4,31 ± 2,65 ^A	2,65 ± 0,58 ^C	11,23 ± 7,37 ^A
<i>BI</i>	2,76 ± 0,75 ^C	4,43 ± 2,60 ^A	2,56 ± 0,70 ^{CD}	10,98 ± 7,28 ^A
<i>BII</i>	3,06 ± 0,72 ^B	3,65 ± 1,50 ^{BC}	2,67 ± 0,77 ^{BC}	9,60 ± 4,56 ^{AB}
<i>CI</i>	2,06 ± 0,48 ^F	3,34 ± 1,22 ^{BC}	1,85 ± 0,52 ^G	6,15 ± 2,88 ^{DE}
<i>CII</i>	2,67 ± 0,90 ^{CD}	3,64 ± 2,27 ^{BC}	2,27 ± 0,65 ^{EF}	7,74 ± 4,23 ^{CD}
<i>DI</i>	3,41 ± 0,78 ^A	2,67 ± 1,59 ^{DE}	2,90 ± 0,65 ^B	8,39 ± 5,50 ^{BC}
<i>DII</i>	2,18 ± 0,53 ^{EF}	2,40 ± 1,04 ^{DE}	2,04 ± 0,50 ^{FG}	4,84 ± 2,36 ^E
<i>EI</i>	2,88 ± 0,70 ^{BC}	2,32 ± 1,20 ^E	2,33 ± 0,54 ^{DE}	5,39 ± 3,15 ^E
<i>EII</i>	2,62 ± 0,76 ^{CD}	3,90 ± 2,09 ^{AB}	2,31 ± 0,72 ^E	8,57 ± 4,10 ^{BC}
<i>FI</i>	3,46 ± 1,03 ^A	3,01 ± 1,35 ^{CD}	3,19 ± 0,72 ^A	8,54 ± 4,21 ^{BC}
<i>FII</i>	2,43 ± 0,81 ^{DE}	3,42 ± 2,12 ^{BC}	2,34 ± 0,81 ^{DE}	7,28 ± 4,12 ^{CD}
<i>F-test</i>	21,39	9,29	21,17	12,15
<i>p</i>	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Utvrđene su značajne razlike između primijenjenih tretmana za sva 4 pokazatelja ($p < 0,0001$) (Tablica 1.). Nakon tretmana DI s nižom koncentracijom floroglucinola (40 mg/L) i tretmana FI koji je uključivao kombinaciju niže koncentracije nano-ZnO i floroglucinola (1 mg/L + 40 mg/L) utvrđeni su značajno viši izdanci u odnosu na ostale primijenjene tretmane. Između ova dva tretmana nije bilo značajne razlike u visini izdanaka, iako su vrijednosti kod tretmana FI bile u prosjeku nešto više (3,46 cm u odnosu na 3,41 cm). Značajno kraće izdanke u odnosu na kontrolu (2,88 cm) ispoljili su tretmani CI (2,06 cm), DII (2,18 cm) i FII (2,43 cm). U usporedbi s kontrolnim tretmanom, kod tretmana BI (2,76 cm), BII (3,06 cm), CII (2,67 cm), EI (2,88 cm), EII (2,62 cm) nisu utvrđene značajne razlike u visini izdanaka.

Broj izdanaka na kontrolnom tretmanu (4,31) i tretmanu BI (4,41) s nižom koncentracijom nano-SiO₂ (30 mg/L) bio je značajno veći u odnosu na tretmane (BII, CI, DI, DII, EI, FI i FII), osim tretmana EII (3,90) koji je uključivao primjenu kombinacije više koncentracije nano-SiO₂ (75 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L). Nije bilo značajne razlike u broju izdanaka između tretmana K, BI i EII. Također nije bilo značajne razlike u broju izdanaka između tretmana BII (3,65), CI (3,34), CII (3, 64), EII (3,90), FI (3,01) i FII (3,42), ali su ovi tretmani razvili značajno veći broj izdanaka u odnosu na tretmane DI, DII i EI. Najmanji broj izdanaka utvrđen je kod tretmana EI (2,32) koji je sadržavao nižu koncentraciju nano-SiO₂ i floroglucinola (30 mg/L + 40 mg/L), DI (2,67) s nižom koncentracijom floroglucinola (40 mg/L) i DII (2,40) s višom koncentracijom floroglucinola (80 mg/L). Između navedenih tretmana (EI, DI i DII) nije bilo značajne razlike u broju izdanaka.

Multiplikacija po izdanku na tretmanu (FI – 3,19) koji je uključivao kombinaciju niže koncentracije nano-ZnO (1 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L) bila je značajno viša u odnosu na sve ostale tretmane u istraživanju. Također i tretman BI (2,90) inicirao je veću multiplikaciju izdanaka u odnosu na ostale tretmane u istraživanju, osim tretmana FI (3,19) i BII (2,67). Kontrolni tretman (K – 2,65) razvio je značajno veći broj izdanaka u odnosu na tretmane EII (2,31), FII (2,34), EI (2,33), CII (2,27), DII (2,04) i CI (1,85). Najniža multiplikacija po izdanku zabilježena je na tretmanu CI (1,85).

Uzimajući u obzir i broj izdanaka, odnosno multiplikaciju po broju izdanaka, kontrolni tretman K (11,23) i tretman BI (10,98) rezultirali su značajno većom multiplikacijom u odnosu na tretmane CI (6,15), CII (7,47), DI (8,39), DII (4,84), EI (5,39), EII (8,57), FI (8,54) i FII (7,28), osim tretmana BII (9,60). Između tretmana K, BI i BII nema značajne razlike u multiplikaciji po broju izdanaka. Najniža multiplikacija po broju izdanaka zabilježena je na tretmanima DII (4,84) i EI (5,39) koji su razvili značajno manji broj izdanaka od ostalih tretmana, osim tretmana CI (6,15).

Utvrđene su značajne razlike ($p < .0001$) između tretmana u broju listova, broju nodija, dužini internodija i suhoj tvari (Tablica 5.). Najveći broj listova (15,52) zabilježen je na tretmanu FI koji je uključivao kombinaciju niže koncentracije nano-ZnO i floroglucinola. Ovaj tretman razvio je značajno veći broj listova u odnosu na tretmane BI (13,37), BII

(14,38), CI (13,41), CII (13,69), DI (11,35), DII (11,64), EI (12,49) te kontrolnog K tretmana (12,39). Najmanji broj listova zabilježen je na tretmanima DI (11,35), DII (11,64) i kontrolnom K (12,39) tretmanu između kojih nije bilo značajne razlike.

Tablica 5. Razlike u broju listova, broju nodija, dužini internodija i suhoj tvari između primijenjenih tretmana

<i>Tretman</i>	Broj listova	Broj nodija	Dužina internodija (mm)	Suha tvar (%)
Kontrola	12,39 ± 3,43 ^{EF} G	10,38 ± 3,55 ^B	2,64 ± 0,38 ^{CD}	14,47 ± 3,37 ^{BCD}
BI	13,37 ± 2,92 ^{DE}	11,05 ± 3,40 ^B	2,44 ± 0,48 ^D	10,56 ± 1,18 ^E
BII	14,38 ± 2,29 ^{BCD}	13,03 ± 2,30 ^A	2,79 ± 0,54 ^C	12,19 ± 1,81 ^{DE}
CI	13,41 ± 2,47 ^{CDE}	10,26 ± 2,96 ^B	2,61 ± 0,53 ^{CD}	13,10 ± 0,72 ^{DE}
CII	13,69 ± 2,47 ^{CD}	8,88 ± 2,66 ^D	3,45 ± 0,51 ^{AB}	13,48 ± 3,45 ^{CDE}
DI	11,35 ± 2,95 ^G	8,70 ± 2,60 ^{DE}	2,73 ± 0,37 ^{CD}	11,35 ± 1,67 ^{DE}
DII	11,64 ± 2,84 ^{FG}	9,01 ± 2,66 ^{CD}	2,44 ± 0,26 ^D	14,06 ± 2,26 ^{CD}
EI	12,49 ± 3,41 ^{EF}	10,44 ± 4,00 ^B	2,57 ± 0,40 ^{CD}	16,27 ± 1,88 ^{BC}
EII	14,50 ± 3,16 ^{ABC}	10,02 ± 4,00 ^{BC}	3,30 ± 0,78 ^B	17,56 ± 2,92 ^B
FI	15,52 ± 4,42 ^A	12,48 ± 4,37 ^A	2,64 ± 0,44 ^{CD}	10,72 ± 0,92 ^E
FII	14,98 ± 4,09 ^{AB}	7,62 ± 2,50 ^F	3,75 ± 0,59 ^A	23,24 ± 1,72 ^A
F-test	11,46	15,76	15,48	11,47
P	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; p ≤ 0,05).

Broj nodija na tretmanu BII (13,03) i tretmanu FI (12,48) bio je najveći, odnosno značajno veći u odnosu na sve ostale tretmane (Tablica 5.). Između ova dva tretmana nema značajne razlike u broju nodija, jedino je tretman BII razvio nešto malo veći broj nodija. Kontrolni tretman K (10,38), BI (11,05), CI (10,26), EI (10,44) inicirali su značajno veći broj nodija u odnosu na tretmane CII (8,88), DI (8,70), DII (9,01) i FII (7,62). Tretman FII (7,62) razvio je značajno manji broj nodija na izdancima u odnosu na sve primijenjene tretmane u istraživanju.

Dužina internodija (mm) na tretmanu FII (3,75) bila je značajno viša u odnosu na kontrolni tretman (2,64), BI (2,44), BII (2,79), CI (2,61), DI (2,73), DII (2,44), EI (2,57), EII (3,30), FI (2,64), osim tretmana CII (3,45) između kojih nema razlike u dužini internodija. Tretman EII (3,30) inicirao je značajno duže izdanke u odnosu na kontrolni tretman K, BI,

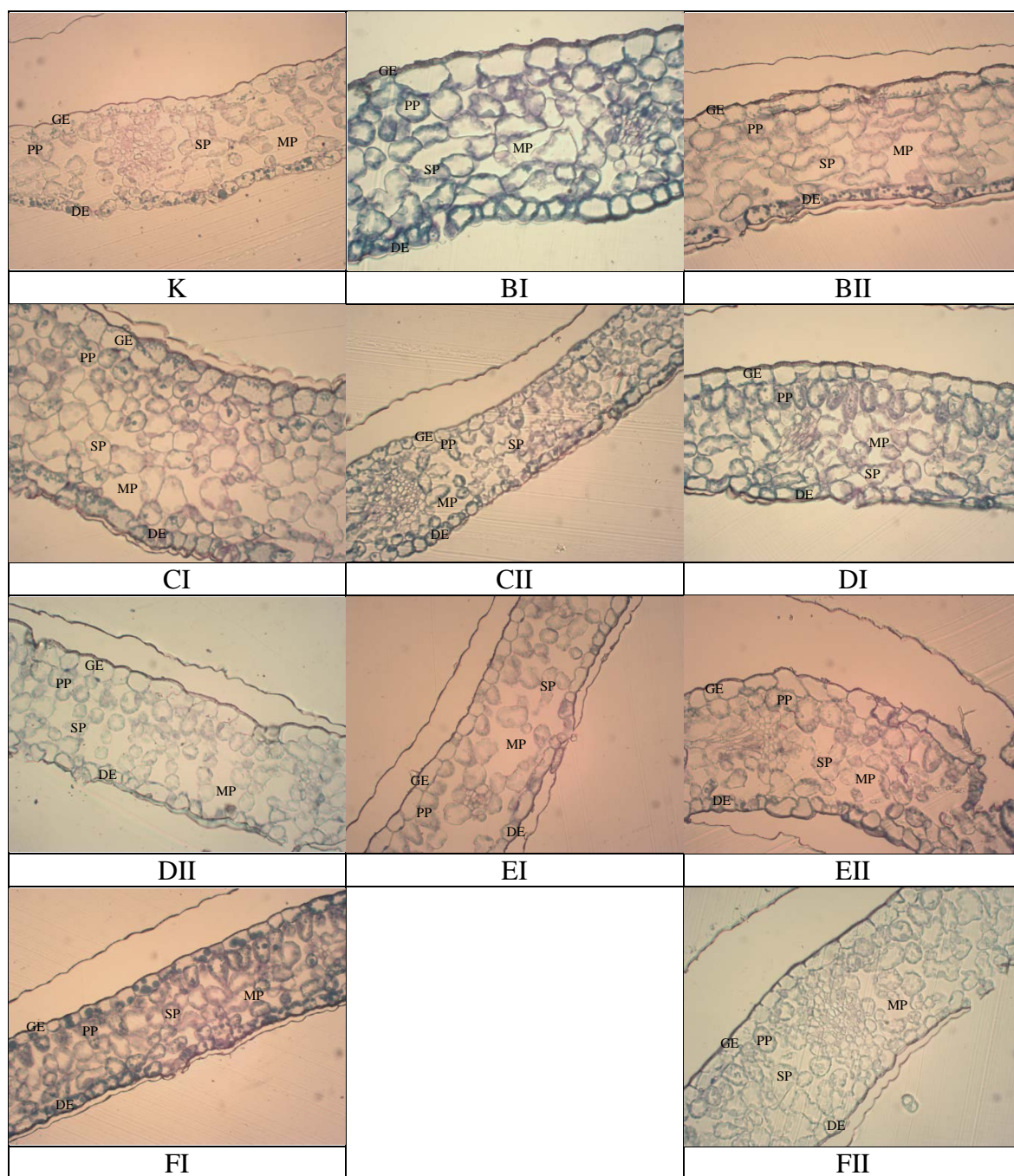
BII, CI, DI, DII, EI i FI. Najkraći internodiji dobiveni su na kontrolnom K tretmanu (2,64), BI (2,44), CI (2,61), DI (2,73), DII (2,44), EI (2,57) i FI (2,64) između kojih nije bilo značajne razlike u dužini internodija (Tablica 5.).

Suha tvar (%) pri tretmanu FII (23,24) bila je značajno viša u odnosu na sve ostale tretmane u istraživanju. Najniža količina suhe tvari zabilježena je na tretmanu BI (10,56), FI (10,72), DI (11,35), BII (12,19), CI (13,10) i tretmanu CII (13,48) između kojih nije bilo značajne razlike. Također nema značajne razlike u suhoj tvari između kontrolnog K tretmana (14,47) i tretmana BII (12,19), CI (13,10), CII (13,48), DI (11,35), DII (14,06), EI (16,27) i tretmana EII (17,56).

Iz dobivenih rezultata (Slika 20., Grafikon 1., Tablica 4. i 5.) vidljivo je da tretman FI koji je uključivao primjenu kombinacija niže koncentracije nano-ZnO (1 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L) rezultira najvećom dužinom izdanaka, a time i multiplikacijom po izdanku, broju listova i broju nodija. Međutim rezultirao je najmanjim brojem izdanaka i dosta kratkim internodijima. Uslijed manje vegetativne mase (broj izdanaka) korelaciono i suha tvar je bila najniža u odnosu na ostale tretmane. Niti jedan od primijenjenih tretmana u istraživanju vizualno nije ispoljio idealniju biomasu potrebnu za daljnje faze mikropropagacije (multiplikacija, ukorjenjivanje ili aklimatizacija). Indeks vitifikacije također je bio vrlo nizak od svega 10 % u bazi izdanka, odnosno zoni vlaženja – imerzije, što je vrlo prihvatljivo.

3.3. Anatomske značajke lista

Vizualnom analizom poprečnog presjeka lista nakon primijenjenih tretmana (Slika 22.) utvrđena je podudaranost indeksa vitifikacije i odstupanja u pravilom rasporedu i diferenciranosti epiderme, palisadnog i spužvastog parenhima. Na kontrolnom tretmanu (K) vidljivo je veliko odstupanje od pravilnog rasporeda palisadnog i spužvastog parenhima. Palisadni parenhim je nepravilno raspoređen, gotovo nepravilnog oblika dok je spužvasti parenhim slabo diferenciran i zastupljen u listu. Također su vidljivi vrlo veliki međustanični prostori.



Slika 22. Poprečni presjek lista borovnice i razlike u anatomiji epiderme i parenhima po ispitivanim tretmanima (GE – gornja epiderma; DE – donja epiderma; PP – palisadni parenhim; SP – spužvasti parenhim; MP – međustanični prostor), (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Slične promjene uočene su i nakon tretmana DII kod kojeg je vidljiv bolje diferenciran samo palisadni parenhim, tretmana EI, gdje su uočeni veliki međustanični

prostori, rijedak spužvasti parenhim te bolje diferenciran palisadni parenhim i tretmana EII s promjenama sličnim prethodnom tretmanu (EI). Indeks vitrifikacije kod tretmana K, DII, EI i EII s vrijednošću od 40 % potvrđuje prisutnost deformiranog ili nedefiniranog staničja te velikih međustaničnih prostora u listu. Kod tretmana CI, CII i FII uočen je karakterističan oblik stanica epiderme, palisadnog i spužvastog parenhima s manjim međustaničnim prostorima (Slika 22.), a dobiveni rezultati u skladu su s indeksom vitrifikacije od 30 %. Kod tretmana BI, BII i DI uočene su karakteristične stanice epiderme i palisadnog parenhima čije su stanice pravilno izdužene i gusto složene, a spužvasti parenhim je pravilno raspoređen što je u skladu s indeksom vitrifikacije od 20 %. Karakteristične stanice epiderme, palisadnog i spužvastog parenhima utvrđene su pri tretmanu FI. Stanice mezofila lista (palisadni i spužvasti parenhim) su pravilno i gusto poslagane jedna uz drugu, pravilnog su oblika i odvojene karakterističnim međustaničnim prostorima. Karakteristično staničje lista borovnice prema diferencijaciji i izgledu stanica epiderme (kutikule), palisadnog i spužvastog parenhima utvrđeno je kod tretmana FI i DI, a rezultati su u skladu s vrijednostima indeksa vitrifikacije.

Analizom puči epiderme listova borovnice utvrđena je značajna razlika između primijenjenih tretmana u broju puči ($p < 0,0001$) po površini epiderme lista (Tablica 6.). Međutim, nisu utvrđene značajne razlike u dužini ($A - p = 0,3247$) i širini puči ($B - p = 0,1077$) te dužini ($a - p = 0,7405$) i širini porusa ($b - p = 0,1401$) puči između primijenjenih tretmana.

Dužina puči (A) kretala se po tretmanima u nizu: BI (26,39 μm) > CI (26,32 μm) > BII (25,78 μm) > FII (25,69 μm) > FI (25,28 μm) > EI (24,50 μm) > K (23,94 μm) > DII (23,66 μm) > CII (23,57 μm) > DI (23,22 μm) > EII (23,18 μm), dok je širina puči po tretmanima slijedila niz: BI (22,61 μm) > CI (21,69 μm) > BII (21,37 μm) > K (20,36 μm) > FII (19,55 μm) > EI (19,46 μm) > EII (19,26 μm) > FI (19,23 μm) > CII (18,54 μm) > DI (18,33 μm) > DII (18,18 μm).

Dužina porusa puči (a) kretala se po tretmanima u nizu: CI (10,54 μm) > BI (10,45 μm) > FII (10,35 μm) > BII (9,98 μm) > FI (9,87 μm) > DI (9,76 μm) > DII (9,62 μm) > EI (9,48 μm) > K (9,35 μm) > CII (8,62 μm) > EII (8,13 μm), dok je širina porusa puči (b) po tretmanima slijedila niz: BI (8,27 μm) > CI (7,80 μm) > BII (7,37 μm) > K (7,24 μm) > FI (6,47 μm) > EI (6,21 μm) > DI (6,09 μm) > FII (5,87 μm) > CII (5,70 μm) > DII (5,51 μm) > EII (4,77 μm).

Tablica 6. Razlike u dimenzijama (μm) i broju puči po primijenjenim tretmanima

<i>Tretman</i>	<i>Dužina puči (A)</i>	<i>Širina puči (B)</i>	<i>Dužina porusa (a)</i>	<i>Širina porusa (b)</i>	<i>Broj puči</i>
<i>Kontrola</i>	23,94 ± 2,27	20,36 ± 2,19	9,35 ± 2,13	7,24 ± 1,73	41,52 ± 1,12 ^E
<i>BI</i>	26,39 ± 1,20	22,61 ± 1,18	10,45 ± 0,71	8,27 ± 0,96	32,49 ± 1,01 ^F
<i>BII</i>	25,78 ± 0,72	21,37 ± 1,38	9,98 ± 0,92	7,37 ± 0,58	34,30 ± 1,43 ^F
<i>CI</i>	26,32 ± 2,29	21,69 ± 2,03	10,54 ± 2,35	7,80 ± 1,83	44,79 ± 1,35 ^D
<i>CII</i>	23,57 ± 1,55	18,54 ± 0,60	8,62 ± 0,71	5,70 ± 0,58	50,93 ± 0,99 ^C
<i>DI</i>	23,22 ± 0,80	18,33 ± 0,87	9,76 ± 0,97	6,09 ± 1,14	61,87 ± 1,04 ^A
<i>DII</i>	23,66 ± 0,45	18,18 ± 0,30	9,62 ± 0,19	5,51 ± 0,05	60,02 ± 0,08 ^A
<i>EI</i>	24,50 ± 2,75	19,46 ± 2,19	9,48 ± 2,31	6,21 ± 1,57	46,72 ± 0,83 ^D
<i>EII</i>	23,18 ± 0,97	19,26 ± 1,76	8,13 ± 0,49	4,77 ± 0,16	55,45 ± 1,03 ^B
<i>FI</i>	25,28 ± 0,70	19,23 ± 0,15	9,87 ± 0,33	6,47 ± 0,91	44,68 ± 0,66 ^D
<i>FII</i>	25,69 ± 1,01	19,55 ± 0,29	10,35 ± 0,11	5,87 ± 0,14	44,77 ± 0,63 ^D
<i>F-test</i>	1,32	2,19	0,66	1,97	180,36
<i>p</i>	0,3247	0,1077	0,7405	0,1401	<,0001

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

U epidermi listova biljaka nakon tretmana DI (61,87) i DII (60,02) koji su uključivali primjenu floroglucinola (40 i 80 mg/L) utvrđen je značajno veći broj puči po površini epiderme u odnosu na ostale primijenjene tretmane. Najmanji broj puči u odnosu na sve ostale tretmane zabilježen je u epidermi listova biljaka tretiranih s obje koncentracije nano-SiO₂ (BI – 32,49 i BII – 34,30). Nije utvrđena značajna razlika u broju puči između tretmana FI (44,68), FII (44,77), EI (46,72) i CI (44,79). Kod svih primijenjenih tretmana, osim BI i BII, utvrđen je značajno veći broj puči po površini epiderme lista u odnosu na kontrolu (41,42). Broj puči po tretmanima kretao se u nizu: DI (61,97) > DII (60,02) > EII (55,45) > CII (50,93) > EI (46,72) > CI (44,79) > FII (44,77) > FI (44,68) > K (41,52) > BII (34,30) > BI (32,49).

3.4. Mineralni sastav tekućeg hranjivog medija i biljnog materijala

Analizom mineralnog sastava hranjivog medija vidljive su razlike u stupnju usvajanja hranjivih elemenata tijekom pokusa (0 do 40 dana).

Nisu utvrđene značajne razlike između tretmana na početku ciklusa (0 dana – $p = 0,1163$), nakon 15 dana ($p = 0,3658$) i na kraju ciklusa (40 dana – $p = 0,1049$) u sadržaju

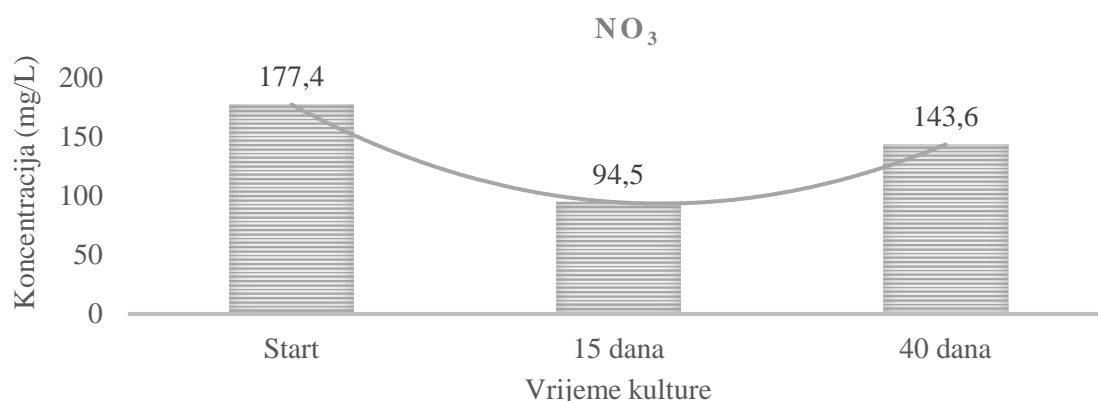
nitratnog (NO_3) oblika dušika (Tablica 7.). Sadržaj NO_3 oblika dušika nakon 15 dana kretao se u nizu: EI (111,95 mg/L) > K (94,95 mg/L) > DI (96,50 mg/L) > DII (96,10 mg/L) > CII (96,40 mg/L) > BII (92,65 mg/L) > FI (91,90 mg/L) > CI (90,90 mg/L) > EII (90,50 mg/L) > BI (86,55 mg/L) > FII (85,35 mg/L), dok je sadržaj NO_3 po tretmanima nakon 40 dana slijedilo niz: EI (160,45 mg/L) > DII (152,60 mg/L) > DI (152,35 mg/L) > CI (148,95 mg/L) > K (143,35 mg/L) > BII (141,75 mg/L) > CII (140,05 mg/L) > FI (137,50 mg/L) > BI (136,05 mg/L) > EII (133,75 mg/L) > FII (125,90 mg/L).

Tablica 7. Razlike u sadržaju NO_3 oblika dušika u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-NO_3 (mg/L)	15-NO_3 (mg/L)	40-NO_3 (mg/L)
<i>Kontrola</i>	187,55 ± 4,60	94,95 ± 15,34	143,35 ± 9,12
<i>BI</i>	176,25 ± 1,63	86,55 ± 12,80	136,05 ± 4,74
<i>BII</i>	179,30 ± 1,70	92,65 ± 6,15	141,75 ± 6,01
<i>CI</i>	174,75 ± 0,49	90,90 ± 13,44	148,95 ± 17,46
<i>CII</i>	176,35 ± 0,21	96,40 ± 13,72	140,05 ± 17,75
<i>DI</i>	176,10 ± 3,68	96,50 ± 0,42	152,35 ± 4,03
<i>DII</i>	174,10 ± 4,67	96,10 ± 1,84	152,60 ± 9,33
<i>EI</i>	182,20 ± 5,52	111,95 ± 1,35	160,45 ± 0,49
<i>EII</i>	184,60 ± 1,13	90,50 ± 8,34	133,75 ± 9,26
<i>FI</i>	165,60 ± 17,39	91,90 ± 1,13	137,50 ± 5,16
<i>FII</i>	184,40 ± 0,57	85,35 ± 2,33	125,90 ± 0,31
<i>F-test</i>	2,12	1,23	2,21
<i>P</i>	0,1163	0,3658	0,1049

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) bez slovne oznake^{AB} statistički se ne razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Utvrđene su oscilacije u koncentraciji nitratnog oblika dušika (NO_3) tijekom kultivacijskog perioda (Grafikon 2.). Na početku kulture (0-ti dan) prosječna početna koncentracija NO_3 u tekućem hranjivom mediju za sve tretmane iznosila je 177,4 mg/L. Nakon 15 dana kulture došlo je do sniženja koncentracije na prosječnih 94,5 mg/L, što predstavlja degradaciju početne koncentracije za 46,7 %. Na kraju kultivacijskog perioda, odnosno nakon 40 dana kulture koncentracija NO_3 se ponovno povećala na prosječno 143,6 mg/L (80,9 % početne koncentracije). Pretpostavljamo da je uslijed rasta i razvoja biljnog materijala tijekom početnih 15 dana kulture došlo do povećanog usvajanja NO_3 potrebnog za stvaranje vegetativne mase.



Grafikon 2. Dinamika kretanja koncentracije NO₃ (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

Nisu utvrđene značajne razlike između tretmana (Tablica 8.) u koncentraciji amonijskog oblika dušika (NH₄) od početka kulture (0-ti dan – $p = 0,6295$) i nakon 15 dana ($p = 0,2328$). Nakon 40 dana kulture utvrđene su značajne razlike u koncentracijama NH₄ između tretmana ($p = 0,0331$). Kod tretmana EI (18,00 ml/L) zabilježena je značajno niža koncentracija NH₄, u odnosu na tretmane K, BI, BII, CI, CII, DII, EII, FI i FII, osim tretmana DI (13,50 ml/L).

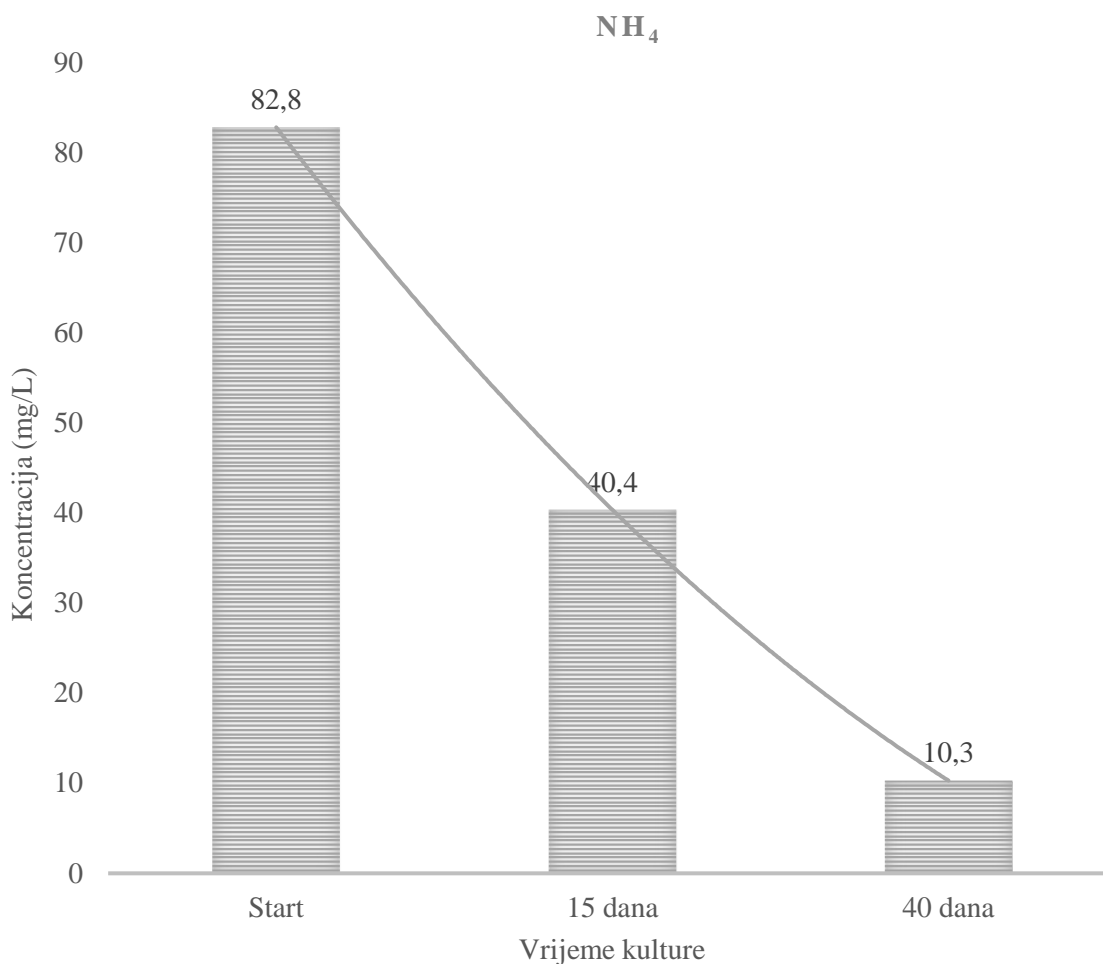
Tablica 8. Razlike u sadržaju NH₄ u hranjivom mediju tijekom ciklusa

Tretman	0-NH ₄ (mg/L)	15-NH ₄ (mg/L)	40-NH ₄ (mg/L)
Kontrola	86,15 ± 0,77	37,55 ± 9,12	10,45 ± 0,07 ^{BC}
BI	77,95 ± 0,63	34,60 ± 4,66	9,35 ± 0,07 ^{BC}
BII	98,75 ± 28,92	39,95 ± 3,74	8,70 ± 1,69 ^{BC}
CI	77,00 ± 0,98	35,05 ± 3,74	7,55 ± 2,47 ^C
CII	81,95 ± 6,71	34,65 ± 8,83	9,10 ± 6,08 ^{BC}
DI	76,65 ± 1,34	42,85 ± 1,34	13,50 ± 1,41 ^{AB}
DII	93,50 ± 23,47	44,70 ± 2,26	10,85 ± 2,61 ^{BC}
EI	79,00 ± 0,28	47,30 ± 6,22	18,00 ± 0,98 ^A
EII	78,10 ± 0,98	40,85 ± 2,75	8,45 ± 1,76 ^{BC}
FI	79,25 ± 1,20	42,15 ± 1,20	9,35 ± 1,90 ^{BC}
FII	82,50 ± 4,38	44,20 ± 1,97	7,90 ± 0,28 ^C
F-test	0,79	1,58	3,24
p	0,6395	0,2328	0,0331

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Nije utvrđena značajna razlika između ostalih tretmana u koncentraciji NH_4 na kraju ciklusa (40 dana). Sadržaj NH_4 nakon 40 dana kulture (kraj ciklusa) po tretmanima kretao se u nizu: EI (18,00 mg/L) > DI (13,50 mg/L) > DII (10,85 mg/L) > K (10,45 mg/L) > BI i FI (9,35 mg/L) > CII (9,10 mg/L) > BII (8,70 mg/L) > EII (8,45 mg/L) > FII (7,90 mg/L) > CI (7,55 mg/L).

Prema grafikonu 3. utvrđeno je smanjenje koncentracije NH_4 u tekućem hranjivom mediju. Tijekom prvih 15 dana kulture došlo je do smanjenja koncentracije s početnih 82,8 mg/L (start) na 40,4 mg/L što pokazuje smanjenje od 51,2 %. Opadanje koncentracije nastavilo se i u preostalim danima te je na kraju ciklusa (40 dana) koncentracija NH_4 u tekućem hranjivom mediju iznosila svega 10,3 mg/l, odnosno smanjila se za 87,6 % početne koncentracije.



Grafikon 3. Dinamika kretanja koncentracije NH_4 (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

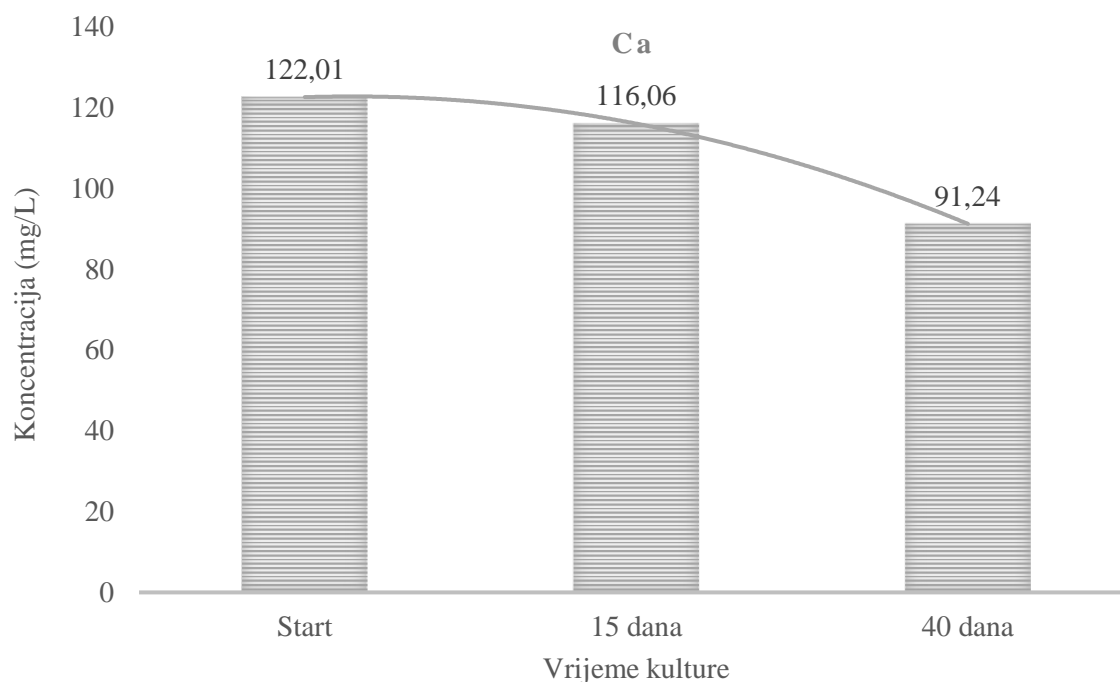
Iako je dodan jednak volumen hranjivog medija, zabilježene su značajne razlike u koncentraciji kalcija (Ca) (Tablica 9.) između primijenjenih tretmana u sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p = 0,0048$; 15-ti dan, $p = 0,0193$ i 40-ti dan, $p = 0,0131$). Na samom startu nakon autoklaviranja (0-ti dan) najniža koncentracija Ca utvrđena je kod tretmana BII (114,85 mg/L), a bila je značajno niža u odnosu na tretmane K, CI, DI, DII, EI, EII i FI. Najveći sadržaj Ca u hranjivom mediju utvrđen je kod tretmana DI (129,79 mg/L) koji je bio značajno veći u odnosu na tretmane K, BI, BII, CII, EII i FII. Nije bilo značajne razlike u sadržaju Ca između kontrolnog tretmana i tretmana BI, CI, CII, DII, EI, EII, FI i FII. Također, nakon 15 dana kulture zabilježene su značajne razlike u koncentraciji Ca između primijenjenih tretmana. Nije bilo značajne razlike u koncentraciji Ca u hranjivom mediju između kontrolnog tretmana i ostalih tretmana, osim tretmana EI (122,96 mg/L) koji je sadržavao značajno višu koncentraciju Ca u odnosu na kontrolni tretman (K), kao i tretmane BI, BII i CII. Nakon 40 dana kulture koncentracije Ca su se ujednačile kod većine tretmana, a jedino je sadržaj neutrošenog Ca kod tretmana EI (106,43 mg/L) i DI (103,98 mg/L) bio značajno veći u odnosu na kontrolnu (87,28 mg/L) i tretmane BI, BII, CI, EII i FII.

Tablica 9. Razlike u sadržaju Ca (kalcija) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-Ca (mg/L)	15-Ca (mg/L)	40-Ca (mg/L)
<i>Kontrola</i>	122,93 ± 0,59 ^{BCDE}	114,27 ± 7,43 ^{BC}	87,28 ± 8,47 ^{CDE}
<i>BI</i>	118,14 ± 4,27 ^{EF}	105,80 ± 3,08 ^C	79,30 ± 6,66 ^E
<i>BII</i>	114,85 ± 1,16 ^F	107,39 ± 3,82 ^C	84,15 ± 8,80 ^{DE}
<i>CI</i>	126,44 ± 1,14 ^{AB}	116,61 ± 8,37 ^{AB}	86,30 ± 9,89 ^{CDE}
<i>CII</i>	119,20 ± 1,18 ^{DEF}	113,80 ± 1,27 ^{BC}	93,01 ± 4,97 ^{BCD}
<i>DI</i>	129,79 ± 1,70 ^A	120,91 ± 0,36 ^{AB}	103,98 ± 5,99 ^{AB}
<i>DII</i>	124,42 ± 0,89 ^{ABCD}	117,73 ± 1,31 ^{AB}	95,13 ± 0,54 ^{ABCD}
<i>EI</i>	124,99 ± 0,68 ^{ABC}	122,96 ± 1,01 ^A	106,43 ± 2,72 ^A
<i>EII</i>	123,62 ± 0,76 ^{BCDE}	118,13 ± 0,50 ^{AB}	85,24 ± 3,10 ^{CDE}
<i>FI</i>	124,90 ± 1,03 ^{ABC}	120,24 ± 1,68 ^{AB}	84,76 ± 5,07 ^{DE}
<i>FII</i>	119,34 ± 6,72 ^{CDEF}	118,78 ± 3,46 ^{AB}	98,06 ± 2,28 ^{ABC}
<i>F-test</i>	5,49	3,80	4,22
<i>P</i>	0,0048	0,0193	0,0131

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Rezultati pokazuju da se koncentracija Ca u hranjivom mediju nakon 15 dana kulture smanjila s početne vrijednosti od 122,01 mg/L za svega 5,3 % (116,06 mg/L), a nakon 40 dana za 25,6 % (91,24 mg/L). Koncentracija Ca u mediju je nakon 40 dana ostala visoka i iznosila je 74,4 % početne koncentracije (91,24 mg/L). Usvojena je $\frac{1}{4}$ početne koncentracije Ca (Grafikon 4.).



Grafikon 4. Dinamika kretanja koncentracije Ca (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

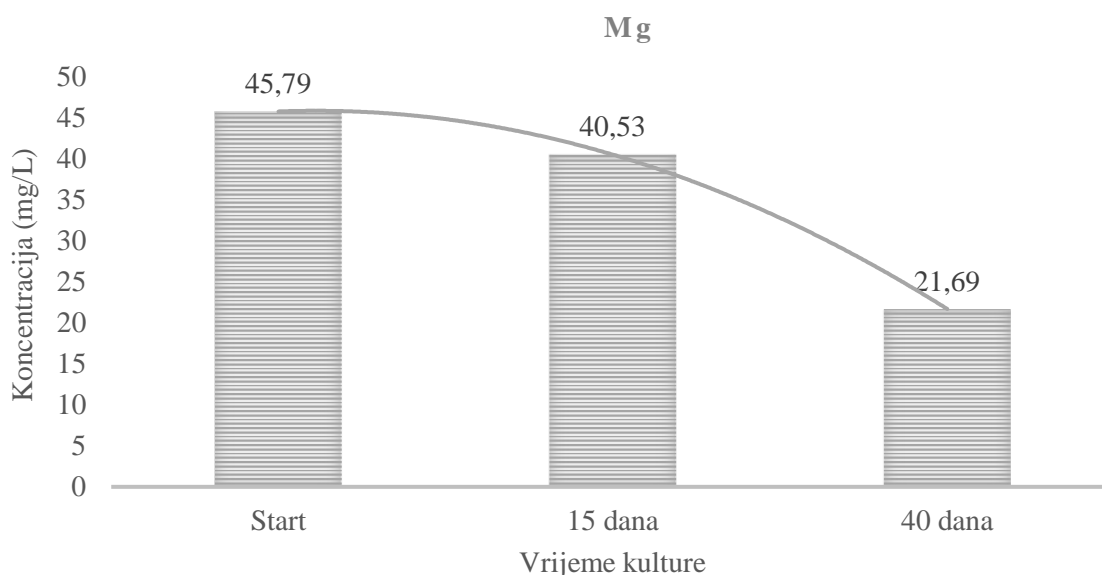
Zabilježene su značajne razlike u koncentraciji magnezija (Mg) (Tablica 10.) između primijenjenih tretmana prilikom sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p = 0,0002$; 15-ti dan, $p = 0,0173$ i 40-ti dan, $p = 0,0381$). Na početku kulture sadržaj Mg u hranjivom mediju kod tretmana DI (47,18 mg/L), CI (46,86 mg/L), DII (46,47 mg/L) i EI (46,57 mg/L) bio je značajno veći u odnosu na kontrolu i tretmane BI, BII, CII i FII. Nakon 15 dana kulture sadržaj Mg kod tretmana CI (39,41 mg/L), DI (42,84 mg/L) i DII (41,46 mg/L) gotovo se ujednačio s kontrolnim tretmanom te nisu utvrđene značajne razlike. Jedino su biljke nakon tretmana BI (36,34 mg/L) utrošile značajno više Mg iz medija u odnosu na kontrolu i tretmane CII, DI, DII, EI, EII, FI i FII. Na kraju ciklusa (40-ti dan) se kod većine tretmana koncentracija Mg u mediju ujednačila s kontrolnim tretmanom. Jedino je kod tretmana FII utvrđen značajno veći sadržaj Mg (35,00 mg/L).

Tablica 10. Razlike u sadržaju Mg (magnezije) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-Mg (mg/L)	15-Mg (mg/L)	40-Mg (mg/L)
<i>Kontrola</i>	45,14 ± 0,11 ^{EFG}	40,21 ± 3,42 ^{BCD}	19,20 ± 5,74 ^{BC}
<i>BI</i>	44,62 ± 0,63 ^{GH}	36,34 ± 2,24 ^E	16,38 ± 2,46 ^{BC}
<i>BII</i>	44,23 ± 0,24 ^H	37,99 ± 1,69 ^{DE}	17,63 ± 4,33 ^{BC}
<i>CI</i>	46,86 ± 0,46 ^{AB}	39,41 ± 2,01 ^{CDE}	15,31 ± 3,54 ^C
<i>CII</i>	44,86 ± 0,03 ^{FGH}	40,45 ± 0,33 ^{BCD}	25,63 ± 6,58 ^{ABC}
<i>DI</i>	47,18 ± 0,02 ^A	42,84 ± 0,73 ^{AB}	24,51 ± 2,88 ^{BC}
<i>DII</i>	46,47 ± 0,33 ^{ABC}	41,46 ± 0,53 ^{ABC}	19,92 ± 0,66 ^{BC}
<i>EI</i>	46,57 ± 0,43 ^{ABC}	44,30 ± 0,04 ^A	26,60 ± 0,20 ^{AB}
<i>EII</i>	45,96 ± 0,11 ^{CDE}	40,58 ± 1,27 ^{BCD}	22,08 ± 9,03 ^{BC}
<i>FI</i>	46,27 ± 0,06 ^{BCD}	40,40 ± 0,37 ^{BCD}	16,32 ± 4,04 ^{BC}
<i>FII</i>	45,53 ± 0,89 ^{DEF}	41,78 ± 0,31 ^{ABC}	35,00 ± 5,07 ^A
<i>F-test</i>	11,65	3,93	3,11
<i>P</i>	0,0002	0,0173	0,0381

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Koncentracija Mg (Grafikon 5.) nakon 15 dana kulture s početnih 45,79 mg/L pala je za 11,5 % (40,53 mg/L), odnosno za 52,6 % (21,69 mg/L) na kraju ciklusa nakon 40 dana. Koncentracija Mg u mediju nakon 40 dana ostala je zadovoljavajuća, odnosno 47,4 % početne koncentracije (21,69 mg/L). Biljni materijal utrošio je nešto više od ½ početne koncentracije magnezija.



Grafikon 5. Dinamika kretanja koncentracije Mg (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

Zabilježene su značajne razlike u koncentraciji kalija (K) (Tablica 11.) između primijenjenih tretmana u sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p < 0,0001$; 15-ti dan, $p = 0,0253$ i 40-ti dan, $p = 0,0146$). Sadržaj K se nakon autoklaviranja u kontrolnom tretmanu (459,32 mg/L) i tretmanima BI (466,82 mg/L), CII (462,05 mg/L) i DII (464,19 mg/L) nije značajno mijenjao. Međutim kontrolni tretman rezultirao je značajno manjim sadržajem K u odnosu na sve ostale tretmane. Najveći sadržaj K zabilježen je kod tretmana FI (482,69 mg/L) koji je bio značajno veći u odnosu na tretmane K, BI, BII, CI, CII, DI, DII, EII i FII. Nakon 15 dana kulture najniži sadržaj K zabilježen je kod tretmana BI (311,66) koji je bio značajno manji u odnosu na tretmane CII, DI, EI i FII. Najviša koncentracija K utvrđena je kod tretmana EI (409,75 mg/L) koji je sadržavao značajno veću količinu K u odnosu na tretmane K, BI, BII, CI, EII i FI. Na kraju ciklusa (40-ti dan) se sadržaj kalija ujednačio kod tretmana K, BI, BII, CI, CII, DI, DII, EII i FI među kojima nije bilo značajne razlike. Najveći sadržaj K u mediju nakon 40 dana izmjeren je kod tretmana EI (206,62 mg/L) i FII (209,29 mg/L) između kojih nije bilo značajne razlike.

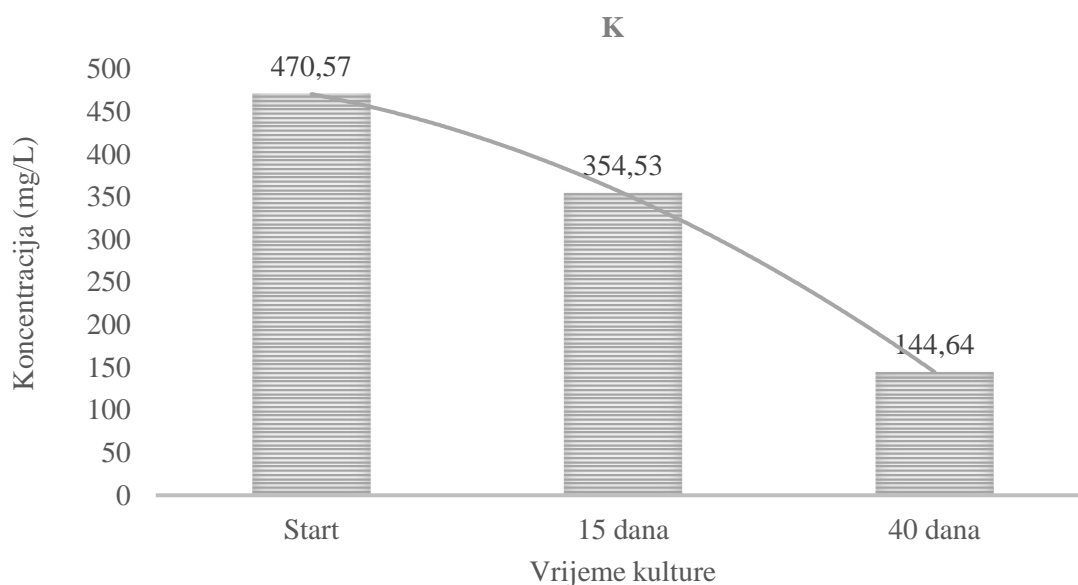
Tablica 11. Razlike u sadržaju kalija (K) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-K (mg/L)	15-K (mg/L)	40-K (mg/L)
<i>Kontrola</i>	459,32 ± 2,51 ^F	339,48 ± 51,49 ^{BCDE}	129,14 ± 47,23 ^{BC}
<i>BI</i>	464,56 ± 0,90 ^{DEF}	311,66 ± 24,21 ^E	112,40 ± 10,60 ^C
<i>BII</i>	466,82 ± 2,26 ^{DE}	336,33 ± 25,17 ^{BCDE}	135,20 ± 35,54 ^C
<i>CI</i>	474,21 ± 0,7 ^{BC}	331,48 ± 38,82 ^{CDE}	108,43 ± 30,72 ^C
<i>CII</i>	462,05 ± 2,21 ^{EF}	371,73 ± 11,75 ^{ABCD}	143,21 ± 28,27 ^{BC}
<i>DI</i>	470,42 ± 5,31 ^{CD}	373,85 ± 5,60 ^{ABCD}	170,12 ± 17,63 ^{AB}
<i>DII</i>	464,19 ± 3,23 ^{EF}	381,75 ± 1,53 ^{ABC}	138,75 ± 9,27 ^{BC}
<i>EI</i>	479,98 ± 2,94 ^{AB}	409,75 ± 5,06 ^A	206,62 ± 3,66 ^A
<i>EII</i>	475,71 ± 0,89 ^{BC}	326,18 ± 23,30 ^{DE}	127,85 ± 16,80 ^{BC}
<i>FI</i>	482,69 ± 0,15 ^A	330,38 ± 6,44 ^{CDE}	110,02 ± 29,20 ^C
<i>FII</i>	476,35 ± 3,52 ^B	387,28 ± 2,6 ^{AB}	209,29 ± 2,34 ^A
<i>F-test</i>	16,78	3,51	4,10
<i>p</i>	<,0001	0,0253	0,0146

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Koncentracija K u hranjivom mediju se s početnih 470,57 mg/L nakon 15 dana kulture smanjila za 24,7 % (354,53 mg/L), a nakon 40 dana za 69,3 % (144,64 mg/L).

Koncentracija elementa K u mediju nakon 40 dana iznosila je 30,7 % početne koncentracije (144,64 mg/L). Biljni materijal ugradio (utrošio) je oko 2/3 početne koncentracije kalija (Grafikon 6.).



Grafikon 6. Dinamika kretanja koncentracije K (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

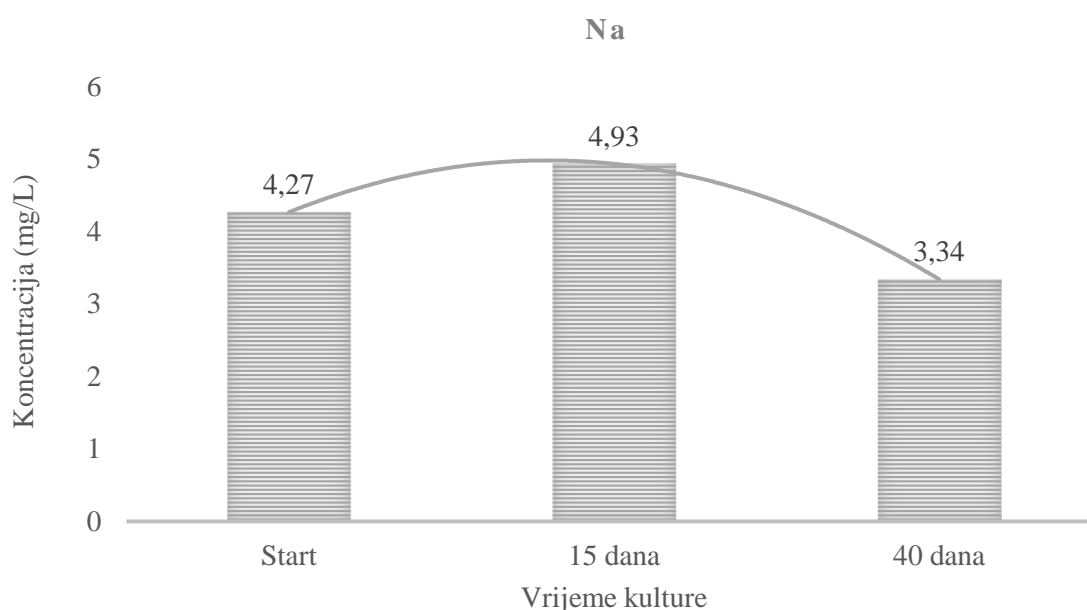
Značajne razlike zabilježene su tijekom pokusa i u sadržaju natrija (Na) (Tablica 12.) između primijenjenih tretmana u sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p < 0,0001$; 15-ti dan, $p = 0,0023$ i 40-ti dan, $p = 0,0076$). Na početku kulture, najmanji sadržaj Na u mediju utvrđen je kod tretmana FII (3,61 mg/L) koji je bio značajno niži u odnosu na sve ostale tretmane. Najveći sadržaj Na utvrđen je kod tretmana CII (6,23 mg/L) koji je bio značajno veći u odnosu na kontrolu i sve ostale primijenjene tretmane. Nakon 15 dana kulture najniži sadržaj Na izmjeren je kod tretmana FI (4,18 mg/L) koji je bio značajno niži u odnosu na kontrolu i tretmane K, BII, DI, DII, EI, EII i FII. Najviša koncentracija Na nakon 15 dana izmjerena je kod tretmana EI (5,75 mg/L), a bila je značajno viša u odnosu na kontrolni tretman K i tretmane BI, BII, CI, CII, FI i FII. Na kraju kulture (40-ti dan) sadržaj Na u mediju se ujednačio kod većine tretmana. Tretmani FII (4,30 mg/L) i EI (4,55 mg/L) rezultirali su najvećim sadržajem Na na kraju ciklusa među kojima nije bilo značajne razlike. Najniže koncentracije Na na kraju ciklusa utvrđene su kod tretmana FI (2,39 mg/L) i CI (2,31 mg/L) između kojih nije bilo značajne razlike.

Tablica 12. Razlike u sadržaju Na (natrija) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-Na (mg/L)	15-Na (mg/L)	40-Na (mg/L)
<i>Kontrola</i>	4,43 ± 0,025 ^B	5,05 ± 0,42 ^{BCD}	3,21 ± 0,60 ^{BCD}
<i>BI</i>	4,06 ± 0,05 ^{DE}	4,58 ± 0,05 ^{DEF}	2,86 ± 0,05 ^{CD}
<i>BII</i>	4,11 ± 0,05 ^{DE}	4,81 ± 0,28 ^{CDE}	2,97 ± 0,70 ^{CD}
<i>CI</i>	4,05 ± 0,03 ^{DE}	4,51 ± 0,15 ^{DEF}	2,31 ± 0,31 ^D
<i>CII</i>	6,23 ± 0,12 ^A	4,42 ± 0,16 ^{EF}	2,81 ± 0,26 ^{CD}
<i>DI</i>	4,08 ± 0,02 ^{DE}	5,35 ± 0,10 ^{ABC}	4,06 ± 0,21 ^{AB}
<i>DII</i>	3,93 ± 0,01 ^E	5,44 ± 0,34 ^{AB}	3,72 ± 0,55 ^{ABC}
<i>EI</i>	4,16 ± 0,01 ^{CD}	5,75 ± 0,26 ^A	4,55 ± 0,48 ^A
<i>EII</i>	4,34 ± 0,08 ^{BC}	5,19 ± 0,05 ^{ABC}	3,50 ± 0,05 ^{ABC}
<i>FI</i>	3,91 ± 0,01 ^E	4,18 ± 0,09 ^F	2,39 ± 0,37 ^D
<i>FII</i>	3,61 ± 0,26 ^F	4,95 ± 0,50 ^{BCDE}	4,30 ± 0,89 ^A
<i>F-test</i>	104,50	6,57	4,87
<i>P</i>	<,0001	0,0023	0,0076

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Koncentracija Na nakon 15 dana kulture s početnih 4,27 mg/L porasla je na 4,93 mg/L (+15,5 %), da bih se nakon 40 dana kulture (kraj ciklusa) spustila na 3,34 mg/L (-20,8 %). Koncentracija Na u mediju nakon 40 dana ostala je visoka, odnosno 3,34 mg/L (78,2 %). Biljni materijal ugradio je nešto više od 1/5 početne koncentracije natrija (Grafikon 7.).



Grafikon 7. Dinamika kretanja koncentracije Na (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

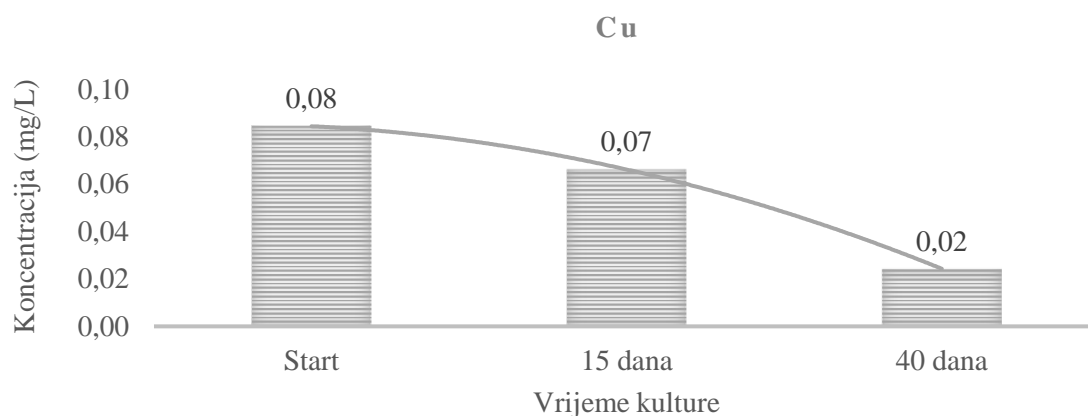
Nisu tvrdene značajne razlike u sadržaju bakra (Cu) između tretmana nakon 15 dana kulture ($p = 0,2781$) i na kraju ciklusa (40-ti dan, $p = 0,3656$) (Tablica 13.). Utvrđena je značajna razlika u sadržaju Cu na početku kulture (0-ti dan, $p < 0,0001$) ali se ona nakon 15 dana i na kraju ciklusa ujednačila s ostalim tretmanima.

Tablica 13. Razlike u sadržaju Cu (bakra) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-Cu (mg/L)	15-Cu (mg/L)	40-Cu (mg/L)
<i>Kontrola</i>	0,09 ± 0,00 ^{AB}	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,01
<i>BI</i>	0,09 ± 0,00 ^A	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<i>BII</i>	0,09 ± 0,00 ^{AB}	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01
<i>CI</i>	0,08 ± 0,00 ^{BC}	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,00
<i>CII</i>	0,08 ± 0,00 ^{CD}	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00
<i>DI</i>	0,08 ± 0,00 ^{DE}	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<i>DII</i>	0,08 ± 0,00 ^C	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<i>EI</i>	0,08 ± 0,00 ^D	0,07 ± 0,00	0,03 ± 0,00
<i>EII</i>	0,08 ± 0,00 ^{CD}	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<i>FI</i>	0,07 ± 0,01 ^E	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<i>FII</i>	0,07 ± 0,00 ^E	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,01
<i>F-test</i>	19,10	1,44	1,23
<i>P</i>	<,0001	0,2781	0,3656

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Koncentracija Cu u hranjivom mediju nakon 15 dana kulture se s početnih 0,08 mg/L smanjila na 0,07 mg/L (-12,5 %), a nakon 40 dana kulture (kraj ciklusa) spustila na 0,02 mg/L (-75 %). Biljni materijal utrošio je 3/4 početne koncentracije bakra (Grafikon 8.).



Grafikon 8. Dinamika kretanja koncentracije Cu (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

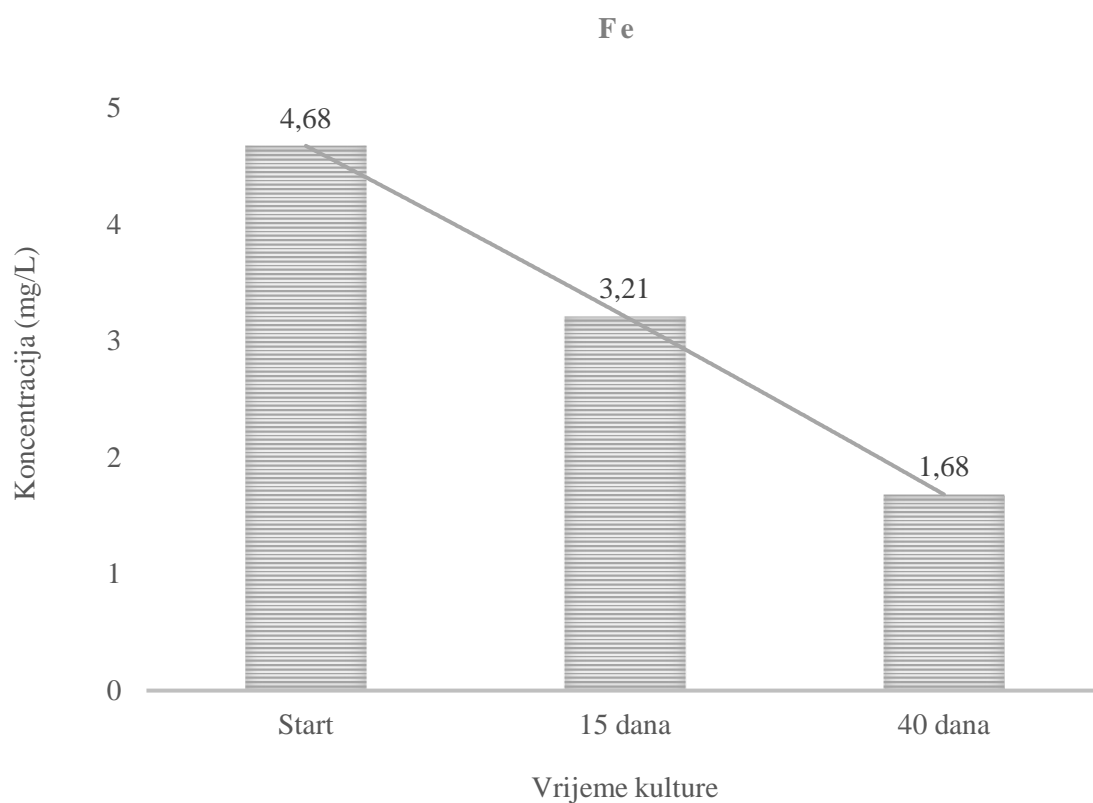
Utvrđene su značajne razlike u sadržaju željeza (Fe) (Tablica 14.) između primijenjenih tretmana u prva dva uzorkovanja (0-ti dan, $p = 0,0023$ i 15-ti dan, $p = 0,0018$). Na samom početku kulture (0-ti dan) najveći sadržaj Fe u hranjivom mediju zabilježen je kod tretmana EI (4,88 mg/L) i DI (4,85 mg/L) koji je bio značajno veći u odnosu na kontrolu i tretmane BI, BII, CII i FII. Najniži sadržaj Fe utvrđen je na tretmanu CII (4,34 mg/L) koji je bio značajno niži u odnosu na tretmane FI, EII, EI, DII, DI, CI, BII, BI i kontrolu. Nakon 15 dana kulture najveći sadržaj Fe i dalje je ostao kod tretmana EI (3,74 mg/L) te je i dalje ostao značajno veći u odnosu na kontrolu i tretmane BI, BII, CI, CII, FI i FII. Najnižu koncentraciju Fe u mediju nakon 15 dana i dalje je sadržavao tretman CII (2,74 mg/L), a bila je značajno niža u odnosu na tretmane FI, EII, EI, DII, DI i kontrolu. Nakon 40 dana kulture svi su se tretmani ujednačili prema sadržaju Fe u hranjivom mediju te između njih nije bilo značajne razlike.

Tablica 14. Razlike u sadržaju Fe (željeza) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-Fe (mg/L)	15-Fe (mg/L)	40-Fe (mg/L)
<i>Kontrola</i>	4,62 ± 0,05 ^{BCD}	3,29 ± 0,20 ^{BC}	1,92 ± 0,43
<i>BI</i>	4,62 ± 0,05 ^{BCD}	2,84 ± 0,14 ^{DE}	1,55 ± 0,07
<i>BII</i>	4,58 ± 0,03 ^{CD}	2,90 ± 0,06 ^{CDE}	1,54 ± 0,05
<i>CI</i>	4,69 ± 0,08 ^{ABCD}	3,03 ± 0,06 ^{CDE}	1,99 ± 0,20
<i>CII</i>	4,35 ± 0,04 ^E	2,74 ± 0,03 ^E	1,61 ± 0,54
<i>DI</i>	4,85 ± 0,11 ^A	3,55 ± 0,01 ^{AB}	1,89 ± 0,01
<i>DII</i>	4,76 ± 0,04 ^{ABC}	3,59 ± 0,08 ^{AB}	1,79 ± 0,01
<i>EI</i>	4,88 ± 0,08 ^A	3,74 ± 0,08 ^A	2,13 ± 0,14
<i>EII</i>	4,79 ± 0,05 ^{AB}	3,55 ± 0,41 ^{AB}	1,26 ± 0,23
<i>FI</i>	4,77 ± 0,05 ^{ABC}	3,23 ± 0,15 ^{BCD}	1,21 ± 0,14
<i>FII</i>	4,49 ± 0,20 ^{DE}	2,83 ± 0,35 ^{DE}	1,58 ± 0,45
<i>F-test</i>	6,51	6,97	2,29
<i>P</i>	0,0023	0,0018	0,0953

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Koncentracija Fe u hranjivom mediju nakon 15 dana kulture smanjila se s početnih 4,68 mg/L na 3,21 mg/L (-31,4 %), a 40-tog dana kulture na 1,68 mg/L (-64,1 %). Koncentracija Fe u mediju nakon 40 dana iznosila je 1,68 mg/L (35,9 %). Biljke su utrošile nešto manje od 2/3 početne koncentracije željeza (Grafikon 9.).



Grafikon 9. Dinamika kretanja koncentracije Fe (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

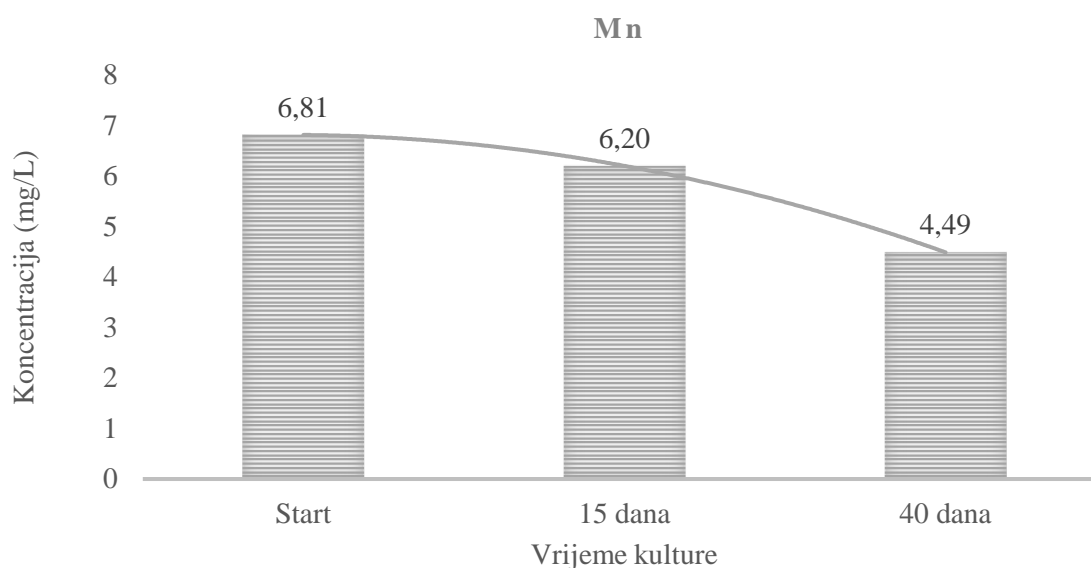
Zabilježene su značajne razlike u koncentraciji mangana (Mn) (Tablica 15.) između primijenjenih tretmana prilikom sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p < 0,0001$; 15-ti dan, $p = 0,0006$ i 40-ti dan, $p = 0,0086$). Na početku kulture najveći sadržaj Mn utvrđen je kod tretmana CI (7,16 mg/L), koji je bio značajno viši u odnosu na ostale tretmane. Najniži sadržaj Mn na početku kulture zabilježen je kod kontrolnog tretmana (6,38 mg/L) koji je bio značajno niži u odnosu na sve tretmane. Nakon 15 dana kulture najniži sadržaj Mn utvrđen je kod tretmana BI (5,51 mg/L), a bio je značajno niži u odnosu na sve tretmane osim kontrolnog tretmana. Najveći sadržaj Mn zabilježen je kod tretmana EI (6,62 mg/L) koji je bio značajno viši u odnosu na tretmane FI, CII, CI, BII, BI i kontrolu. Nakon 40 dana najveći sadržaj Mn u mediju ostao je i dalje kod tretmana EI (5,35 mg/L), DI (5,25 mg/L) i FII (5,22 mg/L) koji je bio značajno viši u odnosu na tretmane FI, EII, CI, BII, BI i kontrolu. Najmanji sadržaj Mn nakon 40 dana izmjeren je kod tretmana BI (3,78 mg/L), FI (3,80 mg/L) i CI (3,84 mg/L) koji je bio značajno niži u odnosu na tretmane FII, EI, DII, DI i CII.

Tablica 15. Razlike u sadržaju Mn (mangana) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-Mn (mg/L)	15-Mn (mg/L)	40-Mn (mg/L)
<i>Kontrola</i>	6,38 ± 0,01 ^G	5,80 ± 0,23 ^{DE}	4,09 ± 0,56 ^{BC}
<i>BI</i>	6,62 ± 0,01 ^F	5,51 ± 0,22 ^E	3,78 ± 0,30 ^C
<i>BII</i>	6,84 ± 0,05 ^{CDE}	6,02 ± 0,21 ^{CD}	4,22 ± 0,71 ^{BC}
<i>CI</i>	7,16 ± 0,04 ^A	6,17 ± 0,28 ^{BC}	3,83 ± 0,38 ^C
<i>CII</i>	6,80 ± 0,03 ^{DE}	6,20 ± 0,01 ^{BC}	4,75 ± 0,19 ^{AB}
<i>DI</i>	6,99 ± 0,05 ^B	6,39 ± 0,02 ^{AB}	5,25 ± 0,34 ^A
<i>DII</i>	6,74 ± 0,02 ^{EF}	6,34 ± 0,04 ^{ABC}	4,74 ± 0,03 ^{AB}
<i>EI</i>	6,92 ± 0,08 ^{BCD}	6,62 ± 0,01 ^A	5,35 ± 0,15 ^A
<i>EII</i>	6,94 ± 0,03 ^{BC}	6,46 ± 0,14 ^{AB}	4,26 ± 0,39 ^{BC}
<i>FI</i>	6,84 ± 0,03 ^{CDE}	6,17 ± 0,04 ^{BC}	3,80 ± 0,50 ^C
<i>FII</i>	6,62 ± 0,12 ^F	6,44 ± 0,01 ^{AB}	5,22 ± 0,19 ^A
<i>F-test</i>	27,19	8,82	4,73
<i>P</i>	<,0001	0,0006	0,0086

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Koncentracija Mn u hranjivom mediju se tijekom 15 dana kulture s početnih 6,81 mg/L smanjila na 6,20 mg/L (-9 %), a nakon 40 dana kulture na 4,49 mg/L (-34,1 %). Koncentracija Mn u mediju nakon 40 dana iznosila je 4,49 mg/L (65,9 %). Biljke su utrošile nešto manje od 1/3 početne koncentracije mangana (Grafikon 10.).



Grafikon 10. Dinamika kretanja koncentracije Mn (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

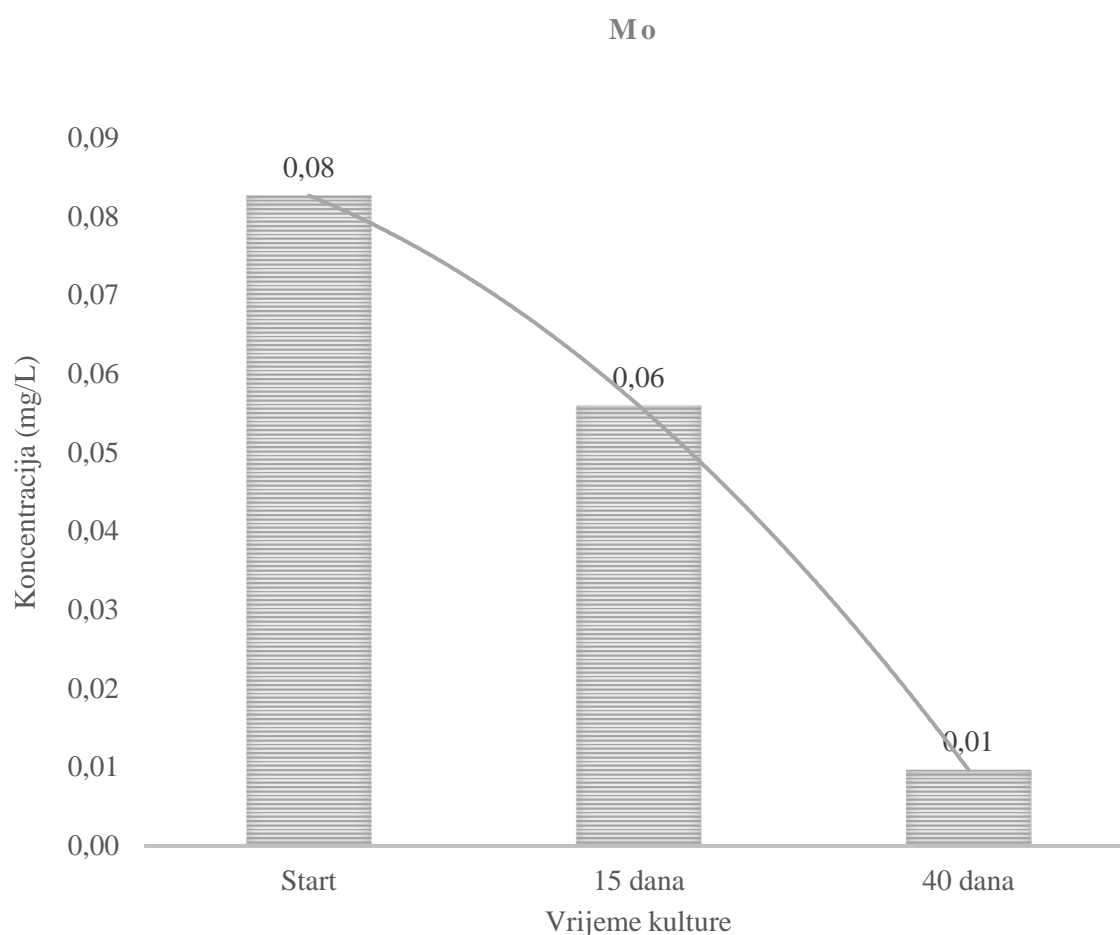
Zabilježene su značajne razlike u koncentraciji molibdena (Mo) (Tablica 16.) između primijenjenih tretmana u sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p < 0,0001$; 15-ti dan, $p < 0,0001$ i 40-ti dan, $p < 0,0001$). Najveći sadržaj Mo na početku kulture zabilježen je kod tretmana BI (0,13 mg/L) koji je bio značajno veći u odnosu na sve primijenjene tretmane. Najniži sadržaj Mo u hranjivom mediju na početku kulture zabilježen je kod tretmana EII i DII (0,05 mg/L) koji je bio značajno niži u odnosu na ostale tretmane. Sadržaj Mo nakon 15 dana kulture bio je najviši na tretmanu CI (0,08 mg/L) koji je bio značajno veći u odnosu na ostale tretmane. Najniži sadržaj Mo nakon 15 dana zabilježen je kod tretmana EII (0,02 mg/L), a bio je značajno niži u odnosu na sve ostale tretmane. Nakon 40 dana kulture kod tretmana FII (0,019 mg/L) utvrđen je značajno veći sadržaj Mo u odnosu na sve ostale tretmane dok je najniža koncentracija utvrđena na tretmanima EII i FI (0,006 mg/L) koja je bila značajno niža u odnosu na tretmane FII, EI, DI, CI i BI.

Tablica 16. Razlike u sadržaju Mo (molibdena) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-Mo (mg/L)	15-Mo (mg/L)	40-Mo (mg/L)
<i>Kontrola</i>	0,08 ± 0,00 ^D	0,05 ± 0,00 ^C	0,008 ± 0,00 ^{CD}
<i>BI</i>	0,13 ± 0,00 ^A	0,07 ± 0,00 ^B	0,009 ± 0,00 ^{BC}
<i>BII</i>	0,08 ± 0,00 ^D	0,05 ± 0,00 ^C	0,009 ± 0,00 ^{BCD}
<i>CI</i>	0,12 ± 0,00 ^B	0,08 ± 0,00 ^A	0,010 ± 0,00 ^B
<i>CII</i>	0,06 ± 0,00 ^F	0,05 ± 0,00 ^C	0,008 ± 0,00 ^{CD}
<i>DI</i>	0,07 ± 0,00 ^E	0,05 ± 0,00 ^C	0,009 ± 0,00 ^{BC}
<i>DII</i>	0,05 ± 0,00 ^G	0,04 ± 0,00 ^D	0,007 ± 0,00 ^{CD}
<i>EI</i>	0,06 ± 0,00 ^F	0,05 ± 0,00 ^C	0,010 ± 0,00 ^{BC}
<i>EII</i>	0,05 ± 0,00 ^G	0,02 ± 0,00 ^E	0,006 ± 0,00 ^D
<i>FI</i>	0,06 ± 0,00 ^F	0,05 ± 0,00 ^C	0,006 ± 0,00 ^D
<i>FII</i>	0,10 ± 0,00 ^C	0,05 ± 0,00 ^C	0,019 ± 0,00 ^A
<i>F-test</i>	478,18	58,78	20,18
<i>p</i>	<,0001	<,0001	<,0001

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Koncentracija Mo nakon 15 dana kulture s početnih 0,08 mg/L pala je na 0,06 mg/L (-25 %), a 40-ti dana kulture na 0,01 mg/L (-87,5 %). Koncentracija Mo u mediju nakon 40 dana iznosila je 0,01 mg/L (12,5 %) što ukazuje da su biljke utrošile gotovo sav početni dodan sadržaj Mo iz hranjivog medija (Grafikon 11.).



Grafikon 11. Dinamika kretanja koncentracije Mo (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

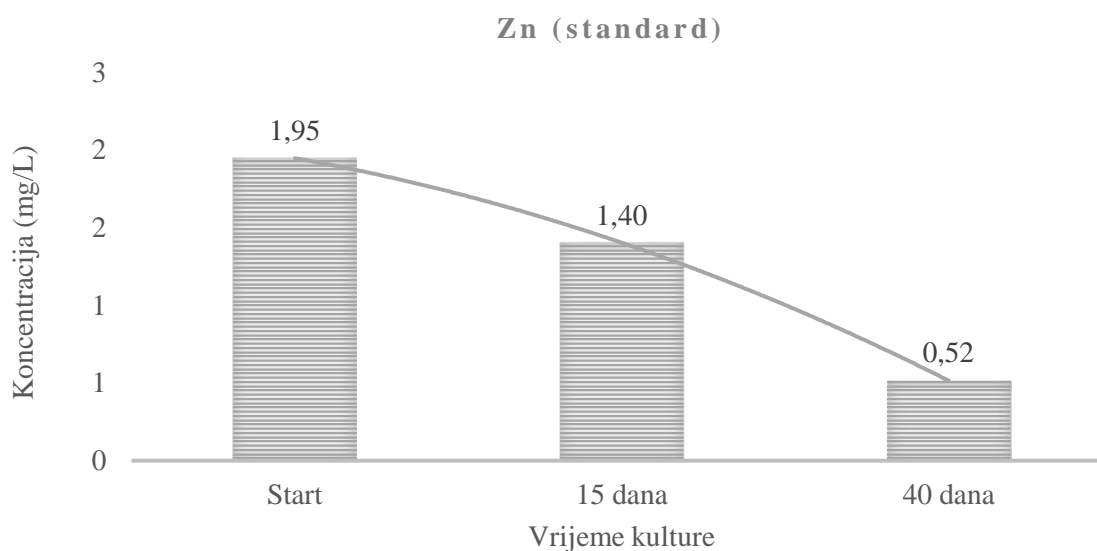
Zabilježene su značajne razlike u koncentraciji cinka (Zn) (Tablica 17.) između primijenjenih tretmana u sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p < 0,0001$; 15-ti dan, $p < 0,0001$ i 40-ti dan, $p < 0,0001$). Najveći sadržaj Zn na početku kulture utvrđen je u tretmanima u kojima su dodane više koncentracije Zn od 10 mg/L: CII (9,38 mg/L) i FII (9,55 mg/L), a sadržaj je bio značajno veći u odnosu na sve ostale tretmane. Nakon 15 i 40 dana kulture sadržaj Zn kod tretmana CII i FII i dalje je bio značajno veći u odnosu na sve ostale tretmane. Najniži sadržaj Zn na početku kulture utvrđen je kod kontrolnog tretmana (1,77 mg/L) i tretmana BII (1,80 mg/L) te je ostao nizak nakon 15 dana kulture, kao i kod tretmana BI (1,21 mg/L) i EII (1,42 mg/L). Na kraju kulture (40-ti dan) koncentracija Zn u hranjivom mediju se ujednačila kod svih tretmana, jedino je kod tretmana s višom koncentracijom nano-ZnO (10 mg/L; CII i FII) i dalje ostala značajno viša.

Tablica 17. Razlike u sadržaju Zn (cinka) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-Zn (mg/L)	15-Zn (mg/L)	40-Zn (mg/L)
<i>Kontrola</i>	1,77 ± 0,01 ^I	1,29 ± 0,17 ^D	0,47 ± 0,17 ^{BC}
<i>BI</i>	1,88 ± 0,01 ^H	1,21 ± 0,16 ^D	0,39 ± 0,05 ^C
<i>BII</i>	1,80 ± 0,00 ^I	1,23 ± 0,08 ^D	0,47 ± 0,07 ^{BC}
<i>CI</i>	2,67 ± 0,02 ^D	1,84 ± 0,20 ^C	0,70 ± 0,24 ^B
<i>CII</i>	9,38 ± 0,01 ^B	6,72 ± 0,38 ^A	2,58 ± 0,01 ^A
<i>DI</i>	2,02 ± 0,01 ^{FG}	1,55 ± 0,06 ^{CD}	0,61 ± 0,08 ^{BC}
<i>DII</i>	2,10 ± 0,02 ^E	1,52 ± 0,06 ^{CD}	0,46 ± 0,02 ^{BC}
<i>EI</i>	1,98 ± 0,03 ^G	1,56 ± 0,00 ^{CD}	0,62 ± 0,01 ^{BC}
<i>EII</i>	2,06 ± 0,02 ^{EF}	1,42 ± 0,10 ^D	0,55 ± 0,20 ^{BC}
<i>FI</i>	2,78 ± 0,01 ^C	1,83 ± 0,10 ^C	0,50 ± 0,11 ^{BC}
<i>FII</i>	9,55 ± 0,04 ^A	5,84 ± 0,14 ^B	2,85 ± 0,18 ^A
<i>F-test</i>	30590,7	271,94	88,34
<i>P</i>	<,0001	<,0001	<,0001

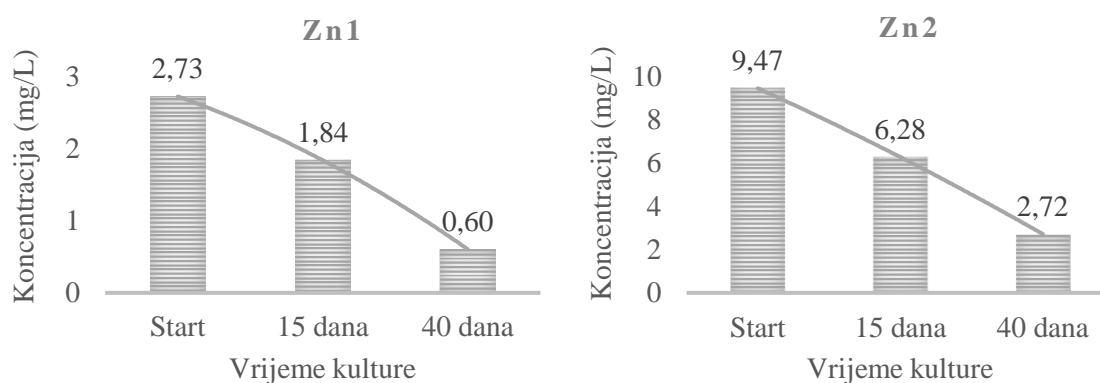
*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Prosječna koncentracija Zn kod svih tretmana koji nisu uključivali dodatnu primjenu nano-ZnO nakon 15 dana kulture s početnih 1,95 mg/L smanjila se na 1,40 mg/L (-28,2 %), a nakon 40 dana kulture na 0,52 mg/L (-73,3 %). Koncentracija Zn u mediju nakon 40 dana iznosila je 0,52 mg/L (26,6 %). Biljke su utrošile nešto manje od 2/3 početne koncentracije cinka (Grafikon 12.).



Grafikon 12. Dinamika kretanja koncentracije Zn (mg/L) u mediju koji nisu uključivali naknadnu primjenu nano-ZnO tijekom 40 dana kulture

Koncentracija Zn kod tretmana koji su sadržavali nižu koncentraciju nano-ZnO od 1 mg/l (Zn1 = CI i FI) nakon 15 dana kulture s početnih 2,73 mg/L pala je na 1,84 mg/L (-32,6 %), a nakon 40 dana kulture na 0,60 mg/L (-78 %). Koncentracija Zn u hranjivom mediju kod tretmana CI i FI nakon 40 dana iznosila je 0,60 mg/L (22 %). Kod tretmana CI i FI biljke su utrošile nešto manje od 2/4 početne koncentracije cinka (Grafikon 13.).



Grafikon 13. Dinamika kretanja koncentracije Zn (mg/L) u mediju na tretmanima CI i FI (1 mg/L nano-ZnO – Zn1) i CII i FII (10 mg/L nano-ZnO – Zn2) tijekom 40 dana kulture

Koncentracija Zn kod tretmana koji su sadržavali veću koncentraciju nano-ZnO od 10 mg/l (Zn2 = CII i FII) nakon 15 dana kulture s početnih 9,47 mg/L pala je na 6,28 mg/L (-33,7 %), a nakon 40 dana kulture na 2,72 mg/L (-71,3 %). Koncentracija Zn u hranjivom mediju kod tretmana CII i FII nakon 40 dana iznosila je 2,72 mg/L (28,7 %). Na tretmanima CII i FII biljke su utrošile nešto manje od 3/4 početne koncentracije cinka (Grafikon 13.).

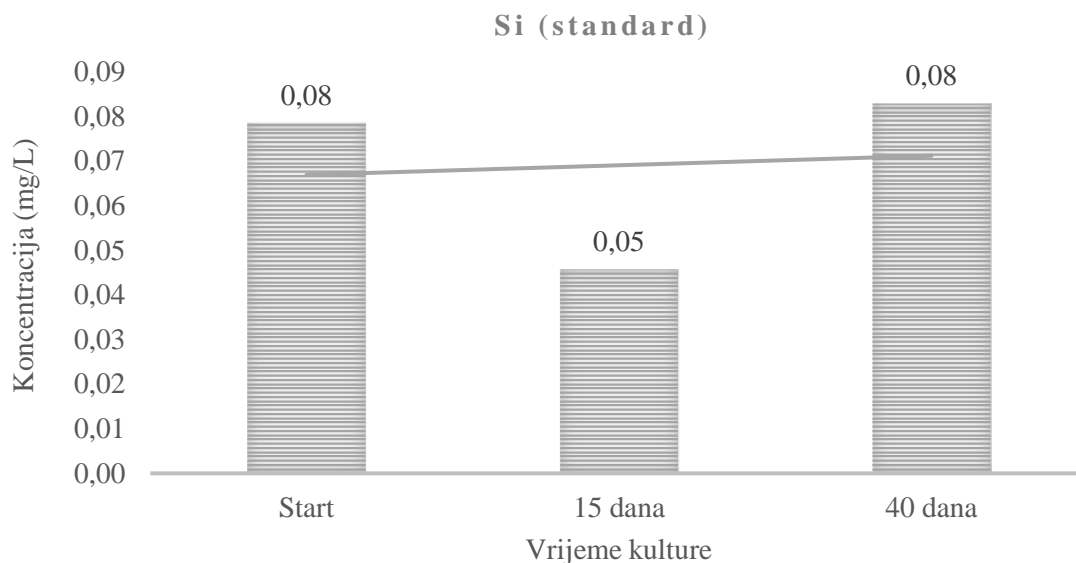
Zabilježene su značajne razlike u koncentraciji silicija (Si) (Tablica 18.) između primijenjenih tretmana u sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p < 0,0001$; 15-ti dan, $p < 0,0001$ i 40-ti dan, $p < 0,0005$). Najveći sadržaj Si na početku kulture, nakon 15 i nakon 40 dana utvrđen je kod tretmana više koncentracije nano-SiO₂ od 75 mg/L (BII – 13,95 mg/L; 5,09 mg/L; 5,15 mg/L te EII – 12,13 mg/L; 4,34 mg/L; 5,41 mg/L) koji su rezultirali značajno većim sadržajem Si u odnosu na sve ostale tretmane i kontrolu. I kod tretmana niže koncentracije nano-SiO₂ od 30 mg/L (BI – 4,85 mg/L; 1,95 mg/L; 2,53 mg/L te EI – 4,86 mg/L; 1,88 mg/L; 1,97 mg/L) utvrđen je značajno veći sadržaj Si u odnosu na ostale tretmane. Nisu utvrđene značajne razlike u sadržaju Si između kontrole i ostalih tretmana (CI, CII, DI, DII, FI i FII).

Tablica 18. Razlike u sadržaju Si (silicija) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-Si (mg/L)	15-Si (mg/L)	40-Si (mg/L)
<i>Kontrola</i>	0,07 ± 0,01 ^C	0,05 ± 0,04 ^C	0,09 ± 0,08 ^C
<i>BI</i>	4,85 ± 0,52 ^B	1,95 ± 0,18 ^B	2,53 ± 0,53 ^B
<i>BII</i>	13,95 ± 0,41 ^A	5,09 ± 0,78 ^A	5,15 ± 0,75 ^A
<i>CI</i>	0,07 ± 0,01 ^C	0,05 ± 0,05 ^C	0,09 ± 0,06 ^C
<i>CII</i>	0,08 ± 0,00 ^C	0,05 ± 0,01 ^C	0,08 ± 0,01 ^C
<i>DI</i>	0,06 ± 0,00 ^C	0,04 ± 0,01 ^C	0,07 ± 0,03 ^C
<i>DII</i>	0,09 ± 0,02 ^C	0,04 ± 0,06 ^C	0,08 ± 0,02 ^C
<i>EI</i>	4,86 ± 0,03 ^B	1,88 ± 0,24 ^B	1,97 ± 0,57 ^B
<i>EII</i>	12,13 ± 0,40 ^A	4,34 ± 0,10 ^A	5,41 ± 0,61 ^A
<i>FI</i>	0,08 ± 0,00 ^C	0,04 ± 0,03 ^C	0,09 ± 0,09 ^C
<i>FII</i>	0,10 ± 0,00 ^C	0,05 ± 0,01 ^C	0,08 ± 0,03 ^C
<i>F-test</i>	962,92	40,00	9,21
<i>P</i>	<,0001	<,0001	0,0005

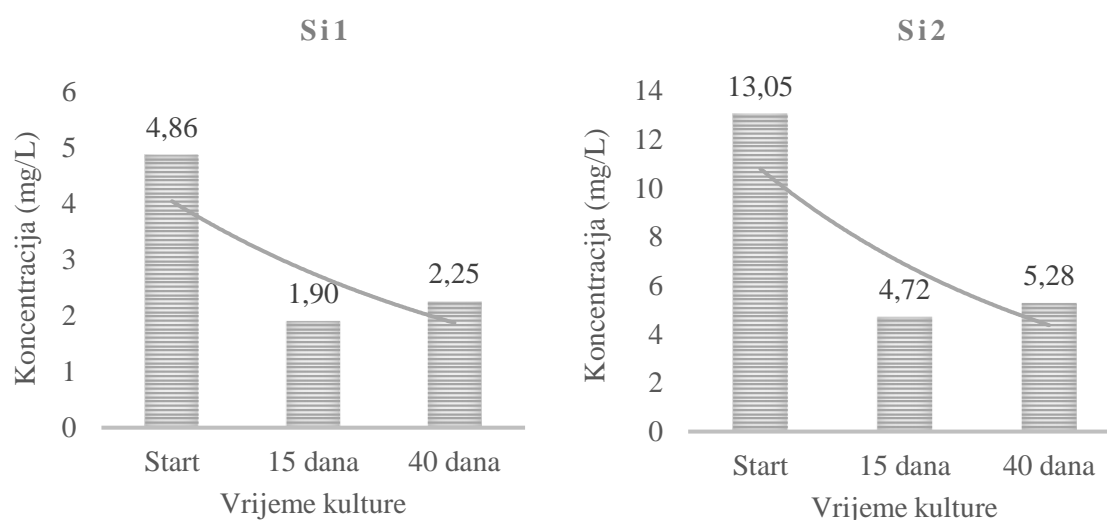
*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Prosječna koncentracija Si kod svih tretmana koji nisu uključivali dodatnu primjenu nano-SiO₂ (Si standard) nakon 15 dana kulture s prosječnih 0,08 mg/L pala je na 0,05 mg/L (-37,5 %), a nakon 40 dana kulture porasla i gotovo se ujednačila s početnom vrijednosti od 0,08 mg/L (Grafikon 14.).



Grafikon 14. Dinamika kretanja koncentracije Si (mg/L) u mediju koji nisu uključivali naknadnu primjenu nano-SiO₂ tijekom 40 dana kulture

Koncentracija Si kod tretmana koji su sadržavali nižu koncentraciju nano-SiO₂ od 30 mg/l (Si1 = BI i EI) nakon 15 dana kulture s početnih 4,86 mg/L pala je na 1,90 mg/L (-60,9%), a nakon 40 dana kulture zanemarivo porasla na 2,25 mg/L (+18,4%). Koncentracija Si u hranjivom mediju na tretmanima BI i EI nakon 40 dana iznosila je prosječno 2,25 mg/L (-53,7%) (Grafikon 15.).



Grafikon 15. Dinamika kretanja koncentracije Si (mg/L) u mediju na tretmanima BI i EI (30 mg/L nano-SiO₂ – Si1) i BII i EII (75 mg/L nano-SiO₂ – Si2) tijekom 40 dana kulture

Koncentracija Si kod tretmana koji su sadržavali višu koncentraciju nano-SiO₂ od 75 mg/l (Si2 = BII i EII) nakon 15 dana kulture s početnih 13,05 mg/L smanjila se na 4,72 mg/L (-63,8%), a nakon 40 dana kulture se neznatno povećala do 5,28 mg/L (+11,9%). Koncentracija Si u hranjivom mediju kod tretmana BII i EII nakon 40 dana iznosila je 5,28 mg/L (-59,5%) (Grafikon 15.).

Zabilježene su značajne razlike u koncentraciji fosfora (P) (Tablica 19.) između primijenjenih tretmana kod sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p < 0,0001$; 15-ti dan, $p < 0,0035$ i 40-ti dan, $p < 0,0480$). Sadržaj P na početku kultivacije bio je značajno veći kod tretmana DI (43,67 mg/L) i CI (42,96 mg/L). Najniži sadržaj P utvrđen je kod tretmana BII (39,46) koji je bio značajno niži u odnosu na tretmane BI, CI, CII, DI, DII, EI, EII i FI. Nakon 15 dana kulture koncentracija P se kod većine tretmana ujednačila. Najniži sadržaj utvrđen je kod tretmana EII (20,91 mg/L), a bio je značajno niži u odnosu na sve tretmane i kontrolu, dok je najveći sadržaj P utvrđen kod tretmana EI (32,31 mg/L). Nakon 40 dana najniža

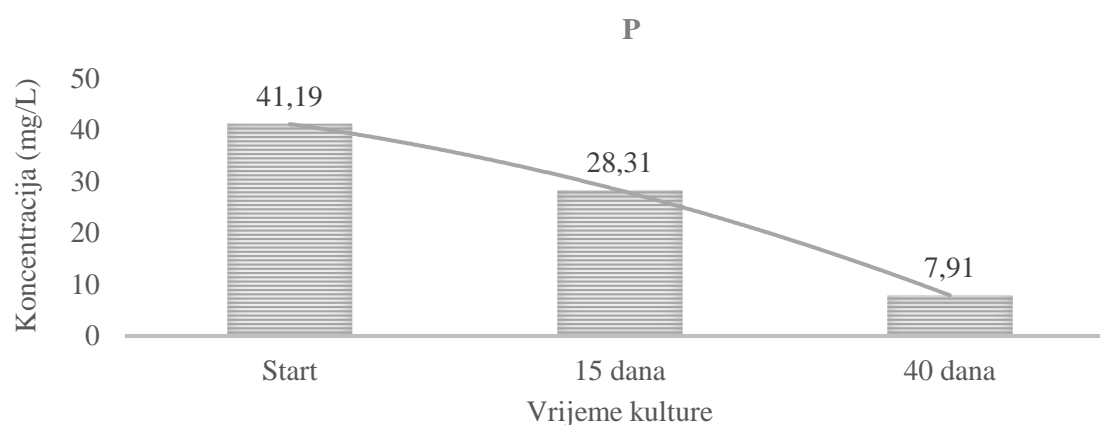
koncentracija P utvrđena je kod tretmana BI (5,33 mg/L) i FI (5,77 mg/L), a bila je značajno niža u odnosu na tretmane DI, EI i FII. Tretman EI (12,74 mg/L) sadržavao je značajno veću koncentraciju P u odnosu na kontrolu i tretmane BI, BII, CI, CII, DII, EII i FI.

Tablica 19. Razlike u sadržaju P (fosfora) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-P (mg/L)	15-P (mg/L)	40-P (mg/L)
<i>Kontrola</i>	39,81 ± 0,31 ^{EF}	28,59 ± 2,38 ^{ABC}	6,81 ± 3,32 ^{CD}
<i>BI</i>	40,17 ± 0,62 ^{CDE}	27,47 ± 2,06 ^{BC}	5,33 ± 1,27 ^D
<i>BII</i>	39,46 ± 0,25 ^F	28,35 ± 1,35 ^{BC}	7,00 ± 2,14 ^{BCD}
<i>CI</i>	42,96 ± 0,03 ^A	29,10 ± 2,30 ^{ABC}	6,05 ± 2,61 ^{CD}
<i>CII</i>	40,55 ± 0,05 ^{CD}	28,33 ± 3,24 ^{BC}	7,58 ± 2,90 ^{BCD}
<i>DI</i>	43,57 ± 0,29 ^A	31,04 ± 0,21 ^{AB}	10,48 ± 1,58 ^{ABC}
<i>DII</i>	41,67 ± 0,05 ^B	30,36 ± 0,04 ^{AB}	7,68 ± 0,93 ^{BCD}
<i>EI</i>	42,14 ± 0,54 ^B	32,31 ± 0,17 ^A	12,74 ± 0,99 ^A
<i>EII</i>	40,85 ± 0,03 ^C	20,91 ± 1,70 ^D	6,02 ± 1,27 ^{CD}
<i>FI</i>	41,79 ± 0,23 ^B	28,95 ± 0,45 ^{ABC}	5,77 ± 2,34 ^D
<i>FII</i>	40,08 ± 0,35 ^{DEF}	25,99 ± 1,61 ^C	11,50 ± 2,02 ^{AB}
<i>F-test</i>	35,09	5,90	2,89
<i>p</i>	<,0001	0,0035	0,0480

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Koncentracija P nakon 15 dana kulture s početnih 41,19 mg/L smanjila se na 28,31 mg/L (-31,3 %), a nakon 40 dana na 7,91 mg/L (-80,8 %). Koncentracija P u mediju nakon 40 dana iznosila je 7,91 mg/L (19,2 %). Biljke su utrošile nešto više od 4/5 početne koncentracije fosfora (Grafikon 16.).



Grafikon 16. Dinamika kretanja koncentracije P (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

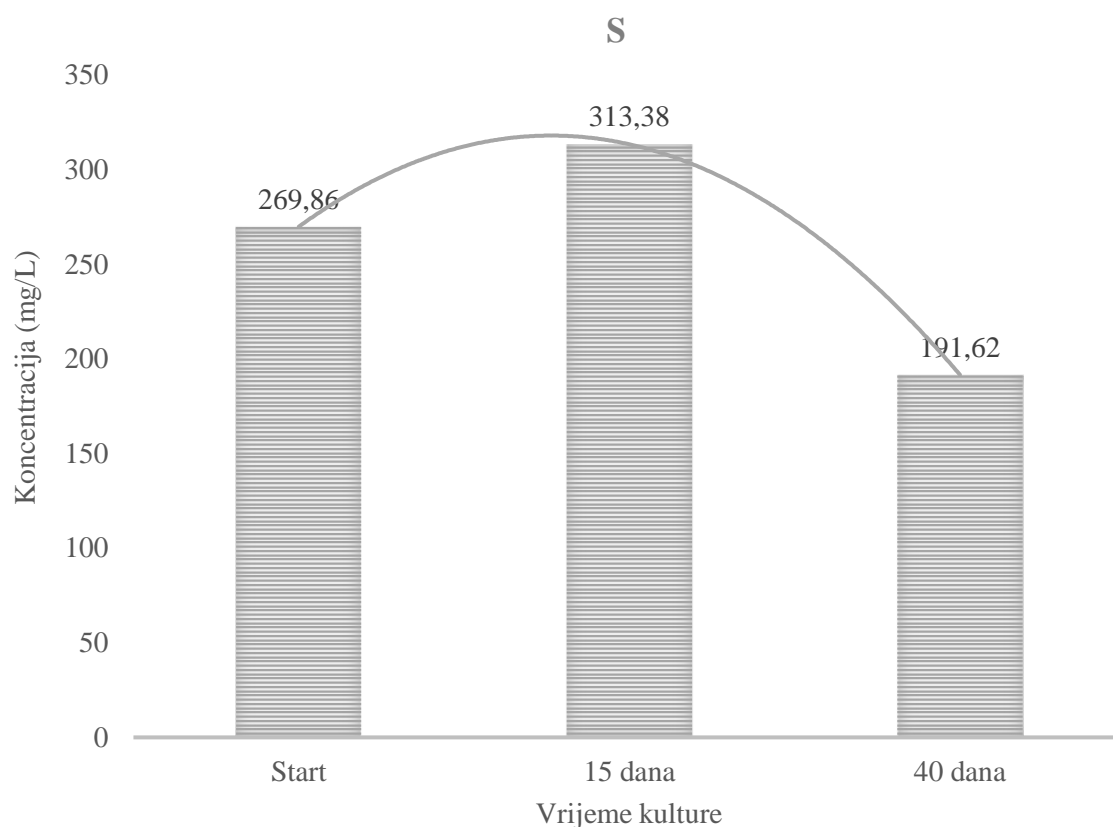
Zabilježene su značajne razlike u koncentraciji sumpora (S) (Tablica 20.) između primijenjenih tretmana kod sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p < 0,0001$; 15-ti dan, $p < 0,0001$ i 40-ti dan, $p < 0,0001$). Značajno veći sadržaj S na početku kulture utvrđen je kod tretmana FII (431,82 mg/L) koji je bio značajno veći u odnosu na sve tretmane i kontrolu. Najmanji sadržaj S u mediju na početku kulture utvrđen je kod kontrolnog tretmana (187,78 mg/L) te kod tretmana BI (188,85 mg/L) i BII (187,69 mg/L) kod koji su utvrđene značajno niže vrijednosti u odnosu na ostale tretmane. Nakon 15 dana kulture značajno veći sadržaj S zabilježen je kod tretmana CII (481,00 mg/L) u odnosu na sve ostale tretmane, dok je značajno manji sadržaj S i dalje ostao kod kontrolnog tretmana (210,25 mg/L), tretmana BI (200,90 mg/L) i BII (210,25 mg/L). Nakon 40 dana kulture najveći sadržaj S utvrđen je u mediju nakon tretmana FII (319,70 mg/L), a vrijednosti u bile značajno više u odnosu na sve ostale tretmane. Značajno manji sadržaj S ostao je u mediju kod kontrolnog tretmana (102,38 mg/L) i tretmanima BI (96,15 mg/L), BII (101,98 mg/L), CI (113,10 mg/L).

Tablica 20. Razlike u sadržaju S (sumpora) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-S (mg/L)	15-S (mg/L)	40-S (mg/L)
<i>Kontrola</i>	187,78 ± 0,28 ^H	210,25 ± 10,25 ^F	102,38 ± 15,58 ^D
<i>BI</i>	188,85 ± 2,16 ^H	200,90 ± 7,63 ^F	96,15 ± 5,21 ^D
<i>BII</i>	187,69 ± 0,82 ^H	210,25 ± 7,28 ^F	101,98 ± 13,61 ^D
<i>CI</i>	220,59 ± 0,84 ^G	246,55 ± 6,71 ^E	113,10 ± 10,04 ^D
<i>CII</i>	380,84 ± 0,02 ^B	481,00 ± 5,37 ^A	279,70 ± 21,92 ^B
<i>DI</i>	259,07 ± 1,15 ^{EF}	317,90 ± 1,69 ^D	188,55 ± 6,71 ^C
<i>DII</i>	310,57 ± 0,90 ^C	390,85 ± 1,48 ^B	245,65 ± 1,06 ^B
<i>EI</i>	261,88 ± 0,62 ^E	327,35 ± 0,49 ^D	197,25 ± 6,15 ^C
<i>EII</i>	258,31 ± 0,94 ^F	317,60 ± 4,10 ^D	199,45 ± 49,00 ^C
<i>FI</i>	280,98 ± 0,47 ^D	343,65 ± 1,06 ^C	191,90 ± 5,79 ^C
<i>FII</i>	431,82 ± 3,94 ^A	400,90 ± 5,65 ^B	391,70 ± 32,52 ^A
<i>F-test</i>	5471,50	517,26	39,14
<i>P</i>	<,0001	<,0001	<,0001

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Koncentracija S nakon 15 dana kulture s početnih 269,86 mg/L porasla je na 313,38 mg/L (+16,1 %), a nakon 40 dana kulture smanjila se na 191,62 mg/L (-29 %). Koncentracija S u mediju nakon 40 dana iznosila je 191,62 mg/L (71 %). Biljke su utrošile nešto više od 1/4 početne koncentracije sumpora (Grafikon 17.).



Grafikon 17. Dinamika kretanja koncentracije S (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

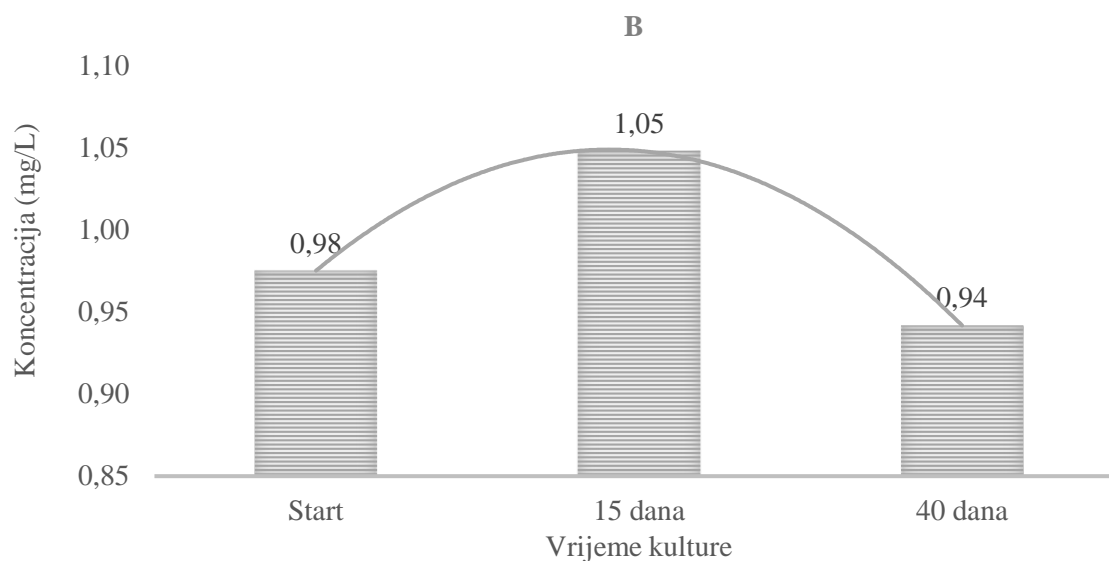
Zabilježene su značajne razlike u koncentraciji bora (B) (Tablica 21.) između primijenjenih tretmana u sva tri uzorkovanja (0-ti dan, $p < 0,0001$; 15-ti dan, $p < 0,0001$ i 40-ti dan, $p < 0,0101$). Najveći sadržaj B na početku kulture utvrđen je na kontrolnom tretmanu (1,02 mg/L) koji je bio značajno veći u odnosu na tretmane BI, BII, CII, DII, EI, EII, FI i FII. Najniži sadržaj B na početku kulture utvrđen je kod tretmana BI (0,91 mg/L) i BII (0,90 mg/L) koji je bio značajno niži u odnosu na sve ostale tretmane. Nakon 30 dana kulture sadržaj B se povećao na svim tretmanima. Najveći sadržaj utvrđen je na kontrolnom tretmanu (1,13 mg/L) ali i tretmanima DI (1,15 mg/L) te EI (1,12 mg/L) koji je bio značajno veći u odnosu na tretmane BI, BII, CI, CII, DII, EII, FI i FII. Najniži sadržaj utvrđen je kod tretmana BI (0,9 mg/L) koji je bio značajno niži u odnosu na sve tretmana osim tretmana BII. Nakon 40 dana kulture najveći sadržaj B utvrđen je kod tretmana DI (1,10 mg/L), a bio je značajno veći u odnosu na tretmane BI, BII, CI, CII, EII i FI. Najniža koncentracija B na kraju ciklusa utvrđena je kod tretmana EII (0,79), a bila je značajno niža u odnosu na kontrolni tretman i tretmane DI, DII, EI i FII.

Tablica 21. Razlike u sadržaju B (bora) u hranjivom mediju tijekom ciklusa

<i>Tretman</i>	0-B (mg/L)	15-B (mg/L)	40-B (mg/L)
<i>Kontrola</i>	1,02 ± 0,01 ^A	1,13 ± 0,06 ^A	0,98 ± 0,04 ^{ABCD}
<i>BI</i>	0,91 ± 0,01 ^G	0,9 ± 0,00 ^E	0,84 ± 0,01 ^{DE}
<i>BII</i>	0,90 ± 0,00 ^G	0,97 ± 0,02 ^{DE}	0,86 ± 0,03 ^{DE}
<i>CI</i>	1,00 ± 0,01 ^{ABC}	1,03 ± 0,01 ^{BC}	0,93 ± 0,01 ^{BCDE}
<i>CII</i>	0,94 ± 0,00 ^F	1,00 ± 0,00 ^{CD}	0,91 ± 0,06 ^{CDE}
<i>DI</i>	1,01 ± 0,01 ^{AB}	1,15 ± 0,00 ^A	1,10 ± 0,01 ^A
<i>DII</i>	0,99 ± 0,01 ^{CD}	1,06 ± 0,02 ^B	1,01 ± 0,03 ^{ABC}
<i>EI</i>	0,98 ± 0,00 ^{CD}	1,12 ± 0,02 ^A	1,07 ± 0,06 ^{AB}
<i>EII</i>	0,97 ± 0,01 ^{DE}	1,05 ± 0,01 ^B	0,79 ± 0,17 ^E
<i>FI</i>	0,99 ± 0,02 ^{BC}	1,02 ± 0,00 ^{BCD}	0,86 ± 0,02 ^{DE}
<i>FII</i>	0,95 ± 0,00 ^{EF}	1,01 ± 0,01 ^{BCD}	0,97 ± 0,01 ^{ABCD}
<i>F-test</i>	30,93	15,68	4,53
<i>P</i>	<,0001	<,0001	0,0101

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Koncentracija B nakon 15 dana kulture s početnih 0,98 mg/L porasla je na 1,05 mg/L (+7,1 %), a nakon 40 dana ponovno pala na 0,94 mg/L (-4,1 %). Koncentracija B u mediju nakon 40 dana iznosila je 0,94 mg/L (95,9 %) (Grafikon 18.).



Grafikon 18. Dinamika kretanja koncentracije B (mg/L) u mediju tijekom 40 dana kulture

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u akumulaciji, odnosno sadržaju sljedećih mineralnih elemenata u biljnom tkivu (Tablica 22.): Ca = p 0,1008, Mg = p 0,1715, K = p

0,8741, Na = p 0,2299, Fe = p 0,4610, Mn = p 0,4117, Mo = p 0,8925, P = p 0,8508 i S = p 0,1707.

Koncentracija Ca u biljnom tkivu po tretmanima kretala se u sljedećem nizu: EII (5,64 g/kg) > CII (5,48 g/kg) > K (5,30 g/kg) > FII (5,15 g/kg) > CI (5,00 g/kg) > BI (4,69 g/kg) > BII (4,67 g/kg) > DII (4,57 g/kg) > FI (4,55 g/kg) > DI (4,50 g/kg) > EI (4,47 g/kg).

Koncentracija Mg u biljnom tkivu (g/kg) po tretmanima kretala se u sljedećem nizu: EI i K (2,92) > CI (2,83) > CII (2,73) > BII (2,68) > BI i FI (2,62) > FII (2,61) > DI, DII i EI (2,55).

Koncentracija K u biljnom tkivu po tretmanima kretala se u sljedećem nizu: K (35,97 g/kg) > EII (34,23 g/kg) > CII (33,33 g/kg) > CI (33,32 g/kg) > EI (32,77 g/kg) > BII (32,72 g/kg) > FII (32,56 g/kg) > DI (32,35 g/kg) > BI (31,98 g/kg) > DII (31,89 g/kg) > FI (31,48 g/kg).

Koncentracija Na u biljnom tkivu po tretmanima kretala se u sljedećem nizu: CII (0,63 g/kg) > EII (0,59 g/kg) > FII (0,56 g/kg) > CI (0,55 g/kg) > K (0,54 g/kg) > BII (0,50 g/kg) > BI, DII i EI (0,48 g/kg) > DI (0,44 g/kg) > FI (0,41 g/kg).

Koncentracija Fe u biljnom tkivu po tretmanima kretala se u sljedećem nizu: EII (0,29 g/kg) > DII i FI (0,24 g/kg) > K, DI i EI (0,23 g/kg) > BI, CII i FII (0,22 g/kg) > BII (0,21 g/kg) > CI (0,20 g/kg).

Koncentracija Mn u biljnom tkivu po tretmanima kretala se u sljedećem nizu: EI (0,33 g/kg) > CII (0,31 g/kg) > CI i FII (0,30 g/kg) > BII (0,29 g/kg) > K (0,28 g/kg) > EI (0,26 g/kg) > BI, DII i FI (0,25 g/kg) > DI (0,24 g/kg).

Koncentracija Mo u biljnom tkivu po tretmanima kretala se u sljedećem nizu: FI (8,38 mg/kg) > BI (7,56 mg/kg) > CII (7,32 mg/kg) > CI (6,61 mg/kg) > K (6,51 mg/kg) > DII (6,45 mg/kg) > DI (6,37 mg/kg) > EII (6,35 mg/kg) > FI (5,50 mg/kg) > EI (4,90 mg/kg) > BII (4,79 mg/kg).

Koncentracija P u biljnom tkivu po tretmanima kretala se u sljedećem nizu: FII (2,89 g/kg) > EII (2,66 g/kg) > K i CII (2,62 g/kg) > CI i EI (2,46 g/kg) > DI (2,40 g/kg) > FI (2,39 g/kg) > BII (2,38 g/kg) > DII (2,33 g/kg) > BI (2,29 g/kg).

Koncentracija S u biljnom tkivu po tretmanima kretala se u sljedećem nizu: CII (13,28 g/kg) > EII (13,10 g/kg) > CI (13,07 g/kg) > FI (12,71 g/kg) > DI (12,66 g/kg) > FII (12,63 g/kg) > EI (12,09 g/kg) > BII (11,78 g/kg) > K (11,76 g/kg) > DI (11,60 g/kg) > BI (11,03 g/kg).

Tablica 22. Elementarni sastav biljnog tkiva (Ca, Mg, K, Na, Fe, Mn, Mo, P, S) po tretmanima

<i>Tretman</i>	Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	K (g/kg)	Na (g/kg)	Fe (g/kg)	Mn (g/kg)	Mo (mg/kg)	P (g/kg)	S (g/kg)
<i>Kontrola</i>	5,30 ± 0,25	2,92 ± 0,19	35,97 ± 1,26	0,54 ± 0,10	0,23 ± 0,01	0,28 ± 0,04	6,51 ± 1,84	2,62 ± 0,22	11,76 ± 0,32
<i>BI</i>	4,69 ± 0,39	2,62 ± 0,11	31,98 ± 0,36	0,48 ± 0,08	0,22 ± 0,02	0,25 ± 0,03	7,56 ± 1,57	2,29 ± 0,50	11,03 ± 0,95
<i>BII</i>	4,67 ± 0,45	2,68 ± 0,13	32,72 ± 0,29	0,50 ± 0,07	0,21 ± 0,04	0,29 ± 0,04	4,79 ± 0,16	2,38 ± 0,55	11,78 ± 0,84
<i>CI</i>	5,00 ± 0,32	2,83 ± 0,12	33,32 ± 0,44	0,55 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,05	6,61 ± 0,45	2,46 ± 0,56	13,07 ± 1,66
<i>CII</i>	5,48 ± 0,69	2,73 ± 0,27	33,33 ± 0,18	0,63 ± 0,01	0,22 ± 0,04	0,31 ± 0,06	7,32 ± 3,26	2,62 ± 0,28	13,28 ± 1,08
<i>DI</i>	4,50 ± 0,30	2,55 ± 0,09	32,35 ± 0,27	0,44 ± 0,00	0,23 ± 0,02	0,24 ± 0,04	6,37 ± 3,69	2,40 ± 0,35	11,60 ± 0,61
<i>DII</i>	4,57 ± 0,26	2,55 ± 0,19	31,89 ± 0,52	0,48 ± 0,01	0,24 ± 0,04	0,25 ± 0,04	6,45 ± 6,04	2,33 ± 0,44	12,66 ± 0,81
<i>EI</i>	4,47 ± 0,32	2,55 ± 0,16	32,77 ± 0,35	0,48 ± 0,00	0,23 ± 0,06	0,26 ± 0,05	4,90 ± 1,86	2,46 ± 0,41	12,09 ± 0,88
<i>EII</i>	5,64 ± 0,56	2,92 ± 0,33	34,23 ± 0,30	0,59 ± 0,01	0,29 ± 0,04	0,33 ± 0,05	6,35 ± 1,68	2,66 ± 0,44	13,10 ± 1,05
<i>FI</i>	4,55 ± 0,89	2,62 ± 0,18	31,48 ± 0,93	0,41 ± 0,00	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,02	5,50 ± 2,90	2,39 ± 0,47	12,71 ± 0,85
<i>FII</i>	5,15 ± 0,93	2,61 ± 0,24	32,56 ± 0,34	0,56 ± 0,06	0,22 ± 0,02	0,30 ± 0,04	8,38 ± 1,18	2,89 ± 0,22	12,63 ± 1,23
<i>F-test</i>	1,90	1,60	0,50	1,43	1,02	1,09	0,47	0,53	1,60
<i>P</i>	0,1008	0,1715	0,8741	0,2299	0,4610	0,4117	0,8923	0,8508	0,1707

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) bez slovne oznake^{AB} statistički se ne razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Utvrđene su značajne razlike u sastavu mineralnih elemenata u biljnom tkivu (Tablica 23.), posebice u akumulaciji Cu, Zn, Si i B.

Tablica 23. Elementarni sastav biljnog tkiva (Cu, Zn, Si, B) po tretmanima

<i>Tretman</i>	Cu (mg/kg)	Zn (g/kg)	Si (g/kg)	B (mg/kg)
<i>Kontrola</i>	7,95 ± 0,96 ^A	0,15 ± 0,03 ^C	0,11 ± 0,03 ^{AB}	37,88 ± 5,50 ^A
<i>BI</i>	6,52 ± 0,13 ^{BC}	0,12 ± 0,02 ^C	0,14 ± 0,02 ^A	30,51 ± 0,70 ^C
<i>BII</i>	6,20 ± 0,36 ^{BC}	0,11 ± 0,02 ^C	0,14 ± 0,01 ^A	32,40 ± 3,45 ^{ABC}
<i>CI</i>	6,57 ± 0,83 ^{BC}	0,30 ± 0,28 ^{BC}	0,10 ± 0,02 ^B	31,13 ± 3,56 ^{BC}
<i>CII</i>	6,66 ± 0,33 ^{BC}	0,57 ± 0,01 ^A	0,11 ± 0,00 ^{AB}	30,10 ± 2,25 ^C
<i>DI</i>	5,61 ± 0,20 ^C	0,13 ± 0,01 ^C	0,08 ± 0,02 ^B	32,44 ± 2,91 ^{ABC}
<i>DII</i>	5,97 ± 0,76 ^{BC}	0,12 ± 0,02 ^C	0,09 ± 0,02 ^B	31,10 ± 2,80 ^{BC}
<i>EI</i>	5,86 ± 0,42 ^C	0,13 ± 0,01 ^C	0,12 ± 0,01 ^{AB}	32,87 ± 0,40 ^{ABC}
<i>EII</i>	7,10 ± 1,12 ^{AB}	0,14 ± 0,01 ^C	0,14 ± 0,03 ^A	37,16 ± 2,85 ^{AB}
<i>FI</i>	5,57 ± 0,98 ^C	0,30 ± 0,27 ^{BC}	0,09 ± 0,00 ^B	37,54 ± 7,37 ^A
<i>FII</i>	6,37 ± 0,55 ^{BC}	0,50 ± 0,06 ^{AB}	0,12 ± 0,01 ^{AB}	38,74 ± 4,12 ^A
<i>F-test</i>	3,07	5,51	2,67	2,31
<i>P</i>	0,0136	0,0004	0,0262	0,0484

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Kontrolni tretman (7,95 mg/kg) akumulirao je značajno višu koncentraciju Cu u odnosu na sve tretmane, osim tretmana EII (7,10 mg/kg). Između tretmana BI (6,62 mg/kg), BII (6,20 mg/kg), CI (6,57 mg/kg), CII (6,66 mg/kg), DI (5,61 mg/kg), DII (5,97 mg/kg), EI (5,86 mg/kg), FI (5,57 mg/kg) i FII (6,37 mg/kg) nije bilo značajne razlike. Tretmani EI (5,86 mg/kg), FI (5,57 mg/kg) i DI (5,61 mg/kg) akumulirali su značajno niže koncentracije Cu u odnosu na kontrolni tretman (7,95 mg/kg) i tretman EII (7,10 mg/kg).

Koncentracija Zn pri tretmanu CII (0,57 g/kg) bila je značajno viša u odnosu na ostale tretmane, osim tretmana FII (0,50 g/kg). Između kontrolnog tretmana (0,15 g/kg) i tretmana BI (0,12 g/kg), BII (0,11 g/kg), CI (0,30 g/kg), DI (0,13 g/kg), DII (0,12 g/kg), EI (0,13 g/kg), EII (0,14 g/kg) i FI (0,09 g/kg) nije bilo značajne razlike u akumulaciji Zn u biljnom tkivu.

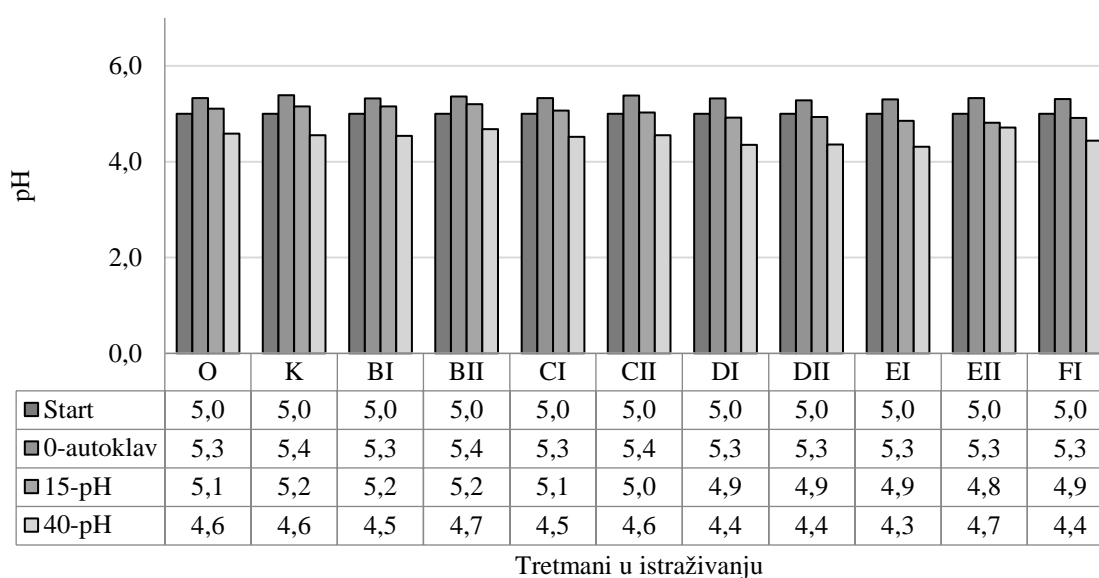
Tretman BI, BII i EII (0,14 g/kg) rezultirali su značajno većom količinom Si u biljnom tkivu u odnosu na tretmane CI (0,10 g/kg), DI (0,08 g/kg), DII (0,09 g/kg) i FI (0,09 g/kg). Između navedenih tretmana nije bilo značajne razlike u koncentraciji Si. Kontrolni tretman K (0,11 g/kg), CII (0,11 g/kg), EI (0,12 g/kg), i FII (0,12 g/kg) rezultirali su nešto

nižom koncentracijom Si u odnosu na tretmane BI, BII i EII, a razlike u vrijednostima nisu bile značajne.

Značajno veći sadržaj B zabilježen je kod kontrolnog tretmana (37,88 mg/kg) te tretmana FI (37,54 mg/kg) i FII (38,74 mg/kg) u odnosu na tretmane BI (30,51 mg/kg), CI (31,13 mg/kg), CII (30,10 mg/kg) i DII (31,10 mg/kg). Nije bilo značajne razlike u sadržaju B između ostalih tretmana BI (30,51 mg/kg), BII (32,40 mg/kg), CI (31,13 mg/kg), CII (30,10 mg/kg), DI (32,44 mg/kg), DI (32,44 mg/kg), DII (31,10 mg/kg) i EI (32,87 mg/kg), te između kontrolnog tretmana (37,88 mg/kg) i tretmana BII (32,40 mg/kg), DI (32,44 mg/kg), EI (32,87 mg/kg), EI (32,87 mg/kg), EII (37,16 mg/kg), FI (37,54 mg/kg) i tretmana FII (38,74 mg/kg).

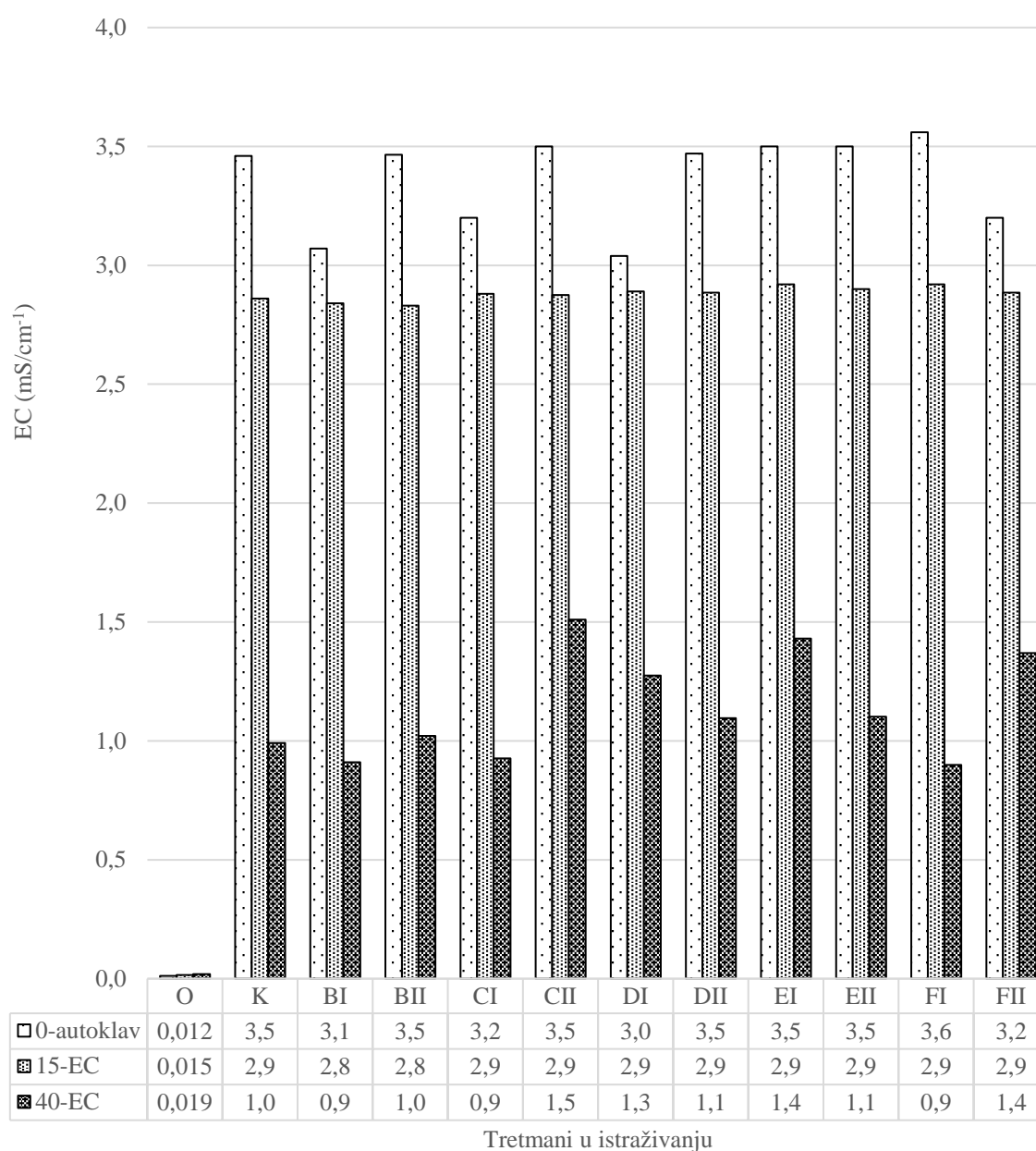
3.5. pH i EC vrijednosti tekućeg hranjivog medija

Prilikom pripreme hranjivog medija, pH vrijednost (start) je prije autoklaviranja podešena na 5,0 kod svih tretmanima, uključujući nulti tretman (bez biljaka). Nakon autoklaviranja (0-autoklav) je kod svih tretmana utvrđeno blago povećanje pH vrijednosti (5,3 do 5,4). Nakon 15 dana kulture pH vrijednost (15-pH) se gotovo izjednačila s početnom vrijednošću prije autoklaviranja (5,0) te se kretala u rasponu od 4,8 do 5,2. Nakon 40 dana kulture (40-pH) utvrđeno je smanjenje pH medija kod svih tretmana, a vrijednosti su se kretale od 4,3 do 4,7 (Grafikon 19.).



Grafikon 19. Dinamika kretanja pH vrijednosti tekućeg hranjivog medija

Također je zabilježeno i smanjenje EC vrijednosti tekućeg hranjivog medija kod svih tretmana (Grafikon 20.). Kod nultog tretmana (O) izmjerena je vrlo niska EC vrijednost od svega $0,012 \text{ mS/cm}^{-1}$ na početku i $0,019 \text{ mS/cm}^{-1}$ na kraju ciklusa. Nakon mjerenja početnih EC vrijednosti (0-autoklav) koja su iznosile od $3,1$ do $3,6 \text{ mS/cm}^{-1}$ te uslijed rasta biljnog materijala nakon 15 dana kulture (15-EC) došlo je do smanjenja i ujednačavanja EC vrijednosti ($2,8$ do $2,9 \text{ mS/cm}^{-1}$). Na kraju kultivacijskog perioda vrijednosti (40-EC) su se kretale od $0,9$ do $1,4 \text{ mS/cm}^{-1}$ (Grafikon 20.).



Grafikon 20. Dinamika kretanja EC (mS/cm^{-1}) vrijednosti tekućeg hranjivog medija u istraživanju

3.6. Fiziološko-biokemijski pokazatelji reakcije biljaka borovnice na primijenjene tretmane

Utvrđene su značajne razlike između tretmana za sve promatrane fiziološko-biokemijske pokazatelje (Tablica 24.). Tretman CI rezultirao je značajno višom koncentracijom fenola (223,46 mg/g) u odnosu na sve tretmane, osim tretmana BI (210,70 mg/g). Kontrolni tretman K (199,77 mg/g), BII (188,42 mg/g), DI (187,67 mg/g), EII (194,38 mg/g) i tretman FII (193,41 mg/g) rezultirali u značajno višom koncentracijom fenolnih spojeva u odnosu na tretmane CII (165,24 mg/g), DII (165,46 mg/g) i FI (159,54 mg/g). Niža koncentracija fenolnih spojeva zabilježena je nakon tretmana FI (159,54 mg/g). Sadržaj fenolnih spojeva nakon 40 dana kulture kretao se u nizu: CI (223,46 mg/g) > BI (210,70 mg/g) > K (199,77 mg/g) > EII (194,38 mg/g) > FII (193,41 mg/g) > BII (188,42 mg/g) > DI (187,67 mg/g) > EI (174,89 mg/g) > DII (165,46 mg/g) > CII (165,24 mg/g) > FI (159,54 mg/g).

Najveća ukupna antioksidacijska aktivnost zabilježena je nakon tretmana CI (58,99 μ g/g), a vrijednosti su bile značajno veće u odnosu na kontrolni tretman (50,48 μ g/g), CII (46,99 μ g/g), EI (48,42 μ g/g), EII (49,78 μ g/g) i tretman FI (41,67 μ g/g). Između kontrolnog tretmana (50,48 μ g/g) i tretmana BI (56,53 μ g/g), BII (56,30 μ g/g), DI (56,37 μ g/g), DII (52,67 μ g/g), EI (48,42 μ g/g), EII (49,78 μ g/g) i FII (54,44 μ g/g) nije bilo značajne razlike u ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti. Najniža vrijednost zabilježena je kod tretmana FI (41,67 μ g/g) koja je bila značajno niža u odnosu na sve tretmane osim tretmana EI i CII.

Najviša koncentracija produkata lipidne peroksidacije (LPO) utvrđena je kod tretmana CI (62,31 nmol/g) i FI (61,89 nmol/g), čije su vrijednosti bile značajno više u odnosu na sve ostale tretmane u istraživanju. Također je i tretman EI (55,02 nmol/g) rezultirao vrlo visokom koncentracijom LPO koja je bila značajna u odnosu na sve tretmane osim tretmana CI i FI. Kontrolni tretman (43,12 nmol/g) rezultirao je značajno višom koncentracijom LPO u odnosu na tretmane CI, FI i EI. Između ostalih tretmana (BI, BII, CII, DII, EII i FII) nije bilo značajne razlike.

Najveći sadržaj askorbinske kiseline (AA) utvrđen je kod tretmana FII (17,45 mg/100g) koji je bio značajno veći u odnosu na sve ostale tretmane u istraživanju. Između kontrolnog tretman (11,66 mg/100g) i tretmana BI (8,50 mg/100g), BII (11,47 mg/100g), CI (12,94 mg/100g), DI (11,16 mg/100g), EI (10,07 mg/100g), EII (12,44 mg/100g) i FI (12,34 mg/100g) nije bilo značajne razlike u koncentraciji AA. Najmanji sadržaj AA dobiven je

kod tretmana CII (7,42 mg/100g) koji je bio značajno niži u odnosu na sve tretmane osim tretmana BI, DII i EI.

Tablica 24. Razlike u sadržaju ukupnih topljivih fenola (PHE), ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti (UAA), koncentraciji produkata lipidne peroksidacije (LPO) i askorbinske kiseline (AA) u biljnom tkivu borovnice po primijenjenim tretmanima

<i>Tretman</i>	PHE (mg/g)	UAA (μg Trolox ekv./g)	LPO (nmol/g)	AA (mg/100g)
<i>Kontrola</i>	199,77 \pm 9,90 ^{BC}	50,48 \pm 4,05 ^{BCD}	43,12 \pm 4,18 ^{CDE}	11,66 \pm 2,19 ^{BC}
<i>BI</i>	210,70 \pm 19,80 ^{AB}	56,53 \pm 5,60 ^{AB}	47,70 \pm 3,08 ^C	8,50 \pm 2,01 ^{CDE}
<i>BII</i>	188,42 \pm 8,71 ^{CD}	56,30 \pm 8,23 ^{AB}	45,07 \pm 1,05 ^{CDE}	11,47 \pm 0,94 ^{BC}
<i>CI</i>	223,46 \pm 14,99 ^A	58,99 \pm 3,69 ^A	62,31 \pm 2,94 ^A	12,94 \pm 1,25 ^B
<i>CII</i>	165,24 \pm 6,15 ^{EF}	46,99 \pm 2,53 ^{DE}	42,41 \pm 5,74 ^{DE}	7,42 \pm 4,42 ^E
<i>DI</i>	187,67 \pm 17,69 ^{CD}	56,37 \pm 7,99 ^{AB}	40,68 \pm 1,41 ^E	11,16 \pm 1,15 ^{BCD}
<i>DII</i>	165,46 \pm 10,10 ^{EF}	52,67 \pm 10,07 ^{ABCD}	46,77 \pm 2,33 ^{CD}	8,06 \pm 3,48 ^{DE}
<i>EI</i>	174,89 \pm 14,55 ^{DE}	48,42 \pm 3,38 ^{CDE}	55,02 \pm 1,01 ^B	10,07 \pm 5,40 ^{BCDE}
<i>EII</i>	194,38 \pm 6,15 ^C	49,78 \pm 6,33 ^{BCD}	45,97 \pm 4,46 ^{CD}	12,44 \pm 2,62 ^B
<i>FI</i>	159,54 \pm 11,81 ^F	41,67 \pm 8,28 ^E	61,89 \pm 3,09 ^A	12,34 \pm 1,16 ^B
<i>FII</i>	193,41 \pm 11,15 ^C	54,44 \pm 5,82 ^{ABC}	47,89 \pm 10,23 ^C	17,45 \pm 3,49 ^A
<i>F-test</i>	14,97	3,84	17,37	5,47
<i>P</i>	<,0001	0,0006	<,0001	<,0001

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost \pm standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; $p \leq 0,05$).

Kao što je vidljivo iz tablice 25. utvrđene su značajne razlike između tretmana u sadržaju klorofila a (Chl a), klorofila b (Chl b), ukupnog klorofila a + b (Chl a + Chl b) i sadržaju karotenoida (Car). Nisu utvrđene značajne razlike između tretmana u omjeru klorofila a i b (Chl a / Chl b) te omjeru karotenoida i ukupnih klorofila a i b (Car / Chl a + Chl b).

Najveći sadržaj klorofila a utvrđen je na kontrolnom tretmanu (0,80 mg/g), tretmanu DI (0,71 mg/g), BII (0,70 mg/g) i BI (0,66 mg/g) između kojih nije bilo značajne razlike. Ostali tretmani u istraživanju CI (0,57 mg/g), CII (0,47 mg/g), DII (0,60 mg/g), EI (0,59 mg/g), EII (0,43 mg/g), FI (0,62 mg/g) i FII (0,26 mg/g) rezultirali su značajno manjim udjelom klorofila a u odnosu na kontrolni tretman. Najniža koncentracija klorofila a utvrđena je kod tretmana FII (0,26 mg/g) koja je bila značajno niža od svih tretmana u istraživanju.

Najveći sadržaj klorofila b utvrđen je također kod kontrolnog tretmana (0,41 mg/g), tretmana DI (0,38 mg/g) i BII (0,32 mg/g) između kojih nije bilo značajne razlike. Ostali tretmani u istraživanju BI (0,30 mg/g), CI (0,27 mg/g), CII (0,21 mg/g), DII (0,26 mg/g), EI (0,27 mg/g), EII (0,19 mg/g), FI (0,29 mg/g) i FII (0,12 mg/g) rezultirali su značajno manjim udjelom klorofila b u odnosu na kontrolni tretman. Najniži sadržaj klorofila b utvrđen je također kod tretmana FII (0,12 mg/g) koji je bio značajno manji u odnosu na sve tretmane, osim tretmana EII (0,19 mg/g) i CII (0,21 mg/g).

Koncentracija ukupnih klorofila a + b uvelike se poklapala s koncentracijom klorofila a. Najveći sadržaj ukupnog klorofila a + b utvrđen je na kontrolnom tretmanu (1,21 mg/g), tretmanima BI (0,97 mg/g), BII (1,02 mg/g) te DI (1,10 mg/g) između kojih nije bilo značajne razlike. Tretmani CI (0,85 mg/g), CII (0,69 mg/g), DII (0,86 mg/g), EI (0,87 mg/g), EII (0,63 mg/g), FI (0,92 mg/g) i tretman FII (0,38 mg/g) rezultirali su značajno manjim sadržajem ukupnog klorofila a + b u odnosu na kontrolni tretman K. Najniža vrijednost ukupnog klorofila a + b zabilježena je kod tretmana FII (0,38 mg/g) koja je bila značajno niža u odnosu na sve ostale tretmane, osim tretmana EII (0,63 mg/g).

Tablica 25. Razlike sadržaja pigmenta u biljnom tkivu po primijenjenim tretmanima

<i>Tretman</i>	<i>Chl a (mg/g)</i>	<i>Chl b (mg/g)</i>	<i>Chl a + b (mg/g)</i>	<i>Car (mg/g)</i>	<i>Chl a / Chl b (mg/g)</i>	<i>Car / Chl a + Chl b (mg/g)</i>
<i>Kontrola</i>	0,80 ± 0,02 ^A	0,41 ± 0,06 ^A	1,21 ± 0,08 ^A	0,22 ± 0,00 ^A	1,97 ± 0,21	0,18 ± 0,00
<i>BI</i>	0,66 ± 0,01 ^{AB}	0,30 ± 0,00 ^{BCD}	0,97 ± 0,01 ^{AB}	0,18 ± 0,00 ^{AB}	2,17 ± 0,02	0,19 ± 0,00
<i>BII</i>	0,70 ± 0,03 ^{AB}	0,32 ± 0,01 ^{ABC}	1,02 ± 0,04 ^{AB}	0,19 ± 0,00 ^{AB}	2,19 ± 0,03	0,19 ± 0,00
<i>CI</i>	0,57 ± 0,12 ^{BCD}	0,27 ± 0,04 ^{CDE}	0,85 ± 0,17 ^{BCD}	0,16 ± 0,03 ^{BCD}	2,08 ± 0,17	0,19 ± 0,00
<i>CII</i>	0,47 ± 0,29 ^{CD}	0,21 ± 0,13 ^{DEF}	0,69 ± 0,42 ^{CD}	0,13 ± 0,07 ^{CD}	2,30 ± 0,14	0,20 ± 0,01
<i>DI</i>	0,71 ± 0,05 ^{AB}	0,38 ± 0,11 ^{AB}	1,10 ± 0,16 ^{AB}	0,20 ± 0,00 ^{AB}	1,93 ± 0,37	0,18 ± 0,02
<i>DII</i>	0,60 ± 0,07 ^{BCD}	0,26 ± 0,03 ^{CDE}	0,86 ± 0,11 ^{BCD}	0,17 ± 0,02 ^{BCD}	2,30 ± 0,08	0,20 ± 0,00
<i>EI</i>	0,59 ± 0,01 ^{BCD}	0,27 ± 0,03 ^{CDE}	0,87 ± 0,04 ^{BCD}	0,17 ± 0,00 ^{BCD}	2,17 ± 0,16	0,19 ± 0,00
<i>EII</i>	0,43 ± 0,18 ^D	0,19 ± 0,10 ^{EF}	0,63 ± 0,28 ^{DE}	0,12 ± 0,05 ^D	2,30 ± 0,24	0,20 ± 0,00
<i>FI</i>	0,62 ± 0,03 ^{BC}	0,29 ± 0,02 ^{BCDE}	0,92 ± 0,05 ^{BC}	0,18 ± 0,00 ^{ABC}	2,12 ± 0,08	0,19 ± 0,00
<i>FII</i>	0,26 ± 0,02 ^E	0,12 ± 0,04 ^F	0,38 ± 0,06 ^E	0,07 ± 0,00 ^E	2,15 ± 0,37	0,20 ± 0,02
<i>F-test</i>	6,70	5,53	6,60	6,32	1,46	1,36
<i>P</i>	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,1994	0,2437

*Podatci su prosjek svih ponavljanja (prosječna vrijednost ± standardna devijacija). Prosječne vrijednosti tretmana (u stupcu tablice) označene različitim slovima^{AB} statistički se značajno razlikuju (Fisher LSD test; p ≤ 0,05).

Kontrolni tretman (1,21 mg/g) i tretmani BI (0,18 mg/g), BII (0,19 mg/g), DI (0,28 mg/g) i FI (0,18 mg/g) rezultirali su najvećim udjelom karotenoida u biljnom tkivu. Između ovih tretmana nije utvrđena značajna razlika. Ostali tretmani CI (0,16 mg/g), CII (0,13 mg/g), DII i EI (0,17 mg/g), EII (0,12 mg/g) te FII (0,07 mg/g) rezultirali su značajno manjim udjelom karotenoida u odnosu na kontrolni tretman. Najniža koncentracija karotenoida zabilježena je kod tretmana FII (0,07 mg/g) koja je bila značajno niža u odnosu na sve primijenjene tretmane u istraživanju.

Nisu utvrđene značajne razlike između primijenjenih tretmana u omjeru klorofila a i klorofila b. Omjer klorofila a i klorofila b po tretmanima se kretao u nizu: CII, DII i EII (2,30 mg/g) > BII (2,18 mg/g) > BI i EI (2,17 mg/g) > FII (2,15 mg/g) > FI (2,12 mg/g) > CI (2,08 mg/g) > K (1,97 mg/g) > DI (1,93 mg/g). Također nema značajne razlike niti u omjeru između karotenoida i ukupnog klorofila a + b (Car / Chl a + Chl b). Koncentracije su slijedile niz: CII, DII, EII i FII (0,20 mg/g) > BI, BII, CI, EI i FI (0,19 mg/g) > K i DI (0,18 mg/g).

3.7. Korelacije između ispitivanih svojstava na biljkama borovnice

Na razini cijelog pokusa linearnom korelacijskom analizom pokazatelja morfoloških svojstava biljaka borovnice (Tablica 26.) utvrđena je vrlo jaka i vrlo značajna ($p \leq 0,01$) pozitivna korelacija ($r = 0,82^{**}$) između broja izdanaka i multiplikacije po broju izdanaka, te potpuna i pozitivna korelacija između veličine izdanaka i multiplikacije po izdanku ($r = 0,95^{**}$). Također utvrđena je i značajno ($p \leq 0,05$) jaka korelacija pozitivnog smjera između broja internodija i multiplikacije po izdanku ($r = 0,73^*$) te između suhe tvari i dužine internodija ($r = 0,71^*$).

Linearnom korelacijskom analizom sadržaja elemenata u hranjivom mediju nakon 15 dana kulture (Tablica 27.) utvrđena je vrlo jaka i vrlo značajna ($p \leq 0,01$) korelacija pozitivnog smjera između sadržaja magnezija i kalcija ($r = 0,89^{**}$), kalija i magnezija ($r = 0,87^{**}$), bakra i nitratnog oblika dušika ($r = 0,75^{**}$), mangana i kalcija ($r = 0,82^{**}$), mangana i magnezija ($r = 0,86^{**}$), sumpora i cinka ($r = 0,75^{**}$), bora i magnezija ($r = 0,75^{**}$), te jaka pozitivna korelacija između sadržaja amonijskog i nitratnog oblika dušika ($r = 0,64^{**}$), nitratnog oblika dušika i kalcija ($r = 0,55^{**}$), nitratnog oblika dušika i magnezija ($r = 0,69^{**}$), nitratnog oblika dušika i kalija ($r = 0,71^{**}$), nitratnog oblika dušika i željeza (r

= 0,54**) nitratnog oblika dušika i fosfora ($r = 0,67^{**}$), amonijskog oblika dušika i kalcija ($r = 0,66^{**}$), amonijskog oblika dušika i magnezija ($r = 0,72^{**}$), amonijskog oblika dušika i kalija ($r = 0,69^{**}$), amonijskog oblika dušika i natrija ($r = 0,55^{**}$), amonijskog oblika dušika i željeza ($r = 0,56^{**}$), amonijskog oblika dušika i ($r = 0,67^{**}$), kalcija i kalija ($r = 0,67^{**}$), kalcija i željeza ($r = 0,55^{**}$), kalcija i bora ($r = 0,69^{**}$), magnezija i natrija ($r = 0,60^{**}$), magnezija i željeza ($r = 0,63^{**}$), kalija i natrija ($r = 0,60^{**}$), kalija i fosfora i sumpora ($r = 0,56^{**}$), natrija i bakra ($r = 0,58^{**}$), natrija i željeza ($r = 0,71^{**}$), natrija i mangana ($r = 0,51^{**}$), bakra i fosfora ($r = 0,55^{**}$), željeza i mangana ($r = 0,53^{**}$), željeza i bora ($r = 0,72^{**}$) te mangana i sumpora ($r = 0,59^{**}$). Također utvrđena je i značajno ($p \leq 0,05$) jaka korelacija pozitivnog smjera između sadržaja nitratnog oblika dušika i natrija ($r = 0,52^*$), nitratnog oblika dušika i mangana ($r = 0,51^*$), nitratnog oblika dušika i bora ($r = 0,52^*$), magnezija i sumpora ($r = 0,50^*$), kalija i bora ($r = 0,51^*$), jaka korelacija negativnog smjera između sadržaja željeza i cinka ($r = -0,51^*$), fosfora i silicija ($r = -0,51^*$). Srednje jaka korelacija pozitivnog smjera između bora i amonijskog oblika dušika ($r = 0,43^*$), kalcija i natrija ($r = 0,42^*$), kalcija i sumpora ($r = 0,45^*$), kalija i bakra ($r = 0,44^*$), bakra i bora ($r = 0,43^*$), mangana i bora ($r = 0,49^*$), molibdena i fosfora ($r = 0,43^*$), te negativnog smjera između kalcija i silicija ($r = -0,44^*$), magnezija i silicija ($r = -0,42^*$), željeza i molibdena ($r = -0,42^*$), te silicija i bora ($r = -0,45^*$).

Linearnom korelacijskom analizom sadržaja elemenata u hranjivom mediju na kraju ciklusa - nakon 40 dana (Tablica 28.) utvrđena je vrlo jaka i vrlo značajna ($p \leq 0,01$) korelacija pozitivnog smjera između sadržaja amonijskog oblika dušika i nitratnog oblika dušika ($r = 0,75^{**}$), kalija i kalcija ($r = 0,87^{**}$), kalija i magnezija ($r = 0,81^{**}$), natrija i kalcija ($r = 0,75^{**}$), natrija i kalija ($r = 0,82^{**}$), željeza i nitratnog oblika dušika ($r = 0,75^{**}$), mangana i magnezija ($r = 0,82^{**}$), mangana i natrija ($r = 0,86^{**}$), te sumpora i cinka ($r = 0,81^{**}$). Jaka pozitivna korelacija između sadržaja kalcija i nitratnog oblika dušika ($r = 0,56^{**}$), magnezija i kalcija ($r = 0,68^{**}$), kalija i amonijskog oblika dušika ($0,59^{**}$), natrija i magnezija ($r = 0,66^{**}$), bakra i amonijskog i nitratnog oblika dušika ($r = 0,61^{**}$), bakra i kalcija ($r = 0,60^{**}$), željeza i amonijskog oblika željeza ($r = 0,58^{**}$), željeza i kalcija ($r = 0,54^{**}$), željeza i bakra ($r = 0,72^{**}$), mangana i amonijskog oblika dušika ($r = 0,54^{**}$), mangana i bakra ($r = 0,59^{**}$), cinka i mangana ($r = 0,68^{**}$), molibdena i magnezija ($r = 0,65^{**}$), molibdena i kalija ($r = 0,64^{**}$), molibdena i cinka ($r = 0,66^{**}$), fosfora i amonijskog oblika dušika ($r = 0,69^{**}$), fosfora i magnezija ($r = 0,74^{**}$), fosfora i natrija ($r = 0,73^{**}$),

fosfora i molibdena ($r = 0,54^{**}$), fosfora i mangana ($r = 0,87^{**}$), sumpora i kalija ($r = 0,59^{**}$), sumpora i mangana ($r = 0,63^{**}$), sumpora i molibdena ($r = 0,58^{**}$), bora i nitratnog oblika dušika ($r = 0,60^{**}$), bora i amonijskog oblika dušika ($r = 0,55^{**}$), bora i kalcija ($r = 0,72^{**}$), bora i natrija ($r = 0,55^{**}$), bora i željeza ($r = 0,71^{**}$), bora i mangana ($r = 0,57$), bora i fosfora ($r = 0,61^{**}$) te negativnog smjera između bora i silicija ($r = -0,60^{**}$). Srednje jaka pozitivnog smjera između molibdena i natrija ($r = 0,44^{**}$) te sumpora i natrija ($r = 0,49^{**}$). Također utvrđena je i značajno ($p \leq 0,05$) jaka korelacija pozitivnog smjera između sadržaja natrija i amonijskog oblika dušika ($r = 0,51^*$), bakra i kalija ($r = 0,52^*$), fosfora i bakra ($r = 0,51^*$), fosfora i željeza ($r = 0,50^*$), te bora i kalija ($r = 0,52^*$). Srednje jaka veza pozitivnog smjera je utvrđena između bakra i natrija ($r = 0,49^*$), željeza i kalija ($r = 0,43^*$), cinka i kalija ($r = 0,47^*$), cinka i mangana ($r = 0,44^*$), molibdena i mangana ($r = 0,46^*$), fosfora i nitratnog oblika dušika ($r = 0,45^*$), sumpora i fosfora ($r = 0,48$), bora i bakra ($r = 0,43^*$), srednje jaka veza negativnog smjera između silicija i kalcija ($r = -0,48^*$), silicija i cinka ($r = -0,43^*$) te silicija i sumpora ($r = -0,46^*$).

Tablica 26. Značajnost linearnih korelacija između ispitivanih morfoloških svojstava biljaka borovnice.

	Broj izdanaka	Visina izdanaka (cm)	Broj listova	Broj nodija	Multiplikacija po izdanku	Multiplikacija po broju izdanaka	Broj internodija	Dužina internodija	Suha tvar
Broj izdanaka	1,00								
Visina izdanaka (cm)	-0,06	1,00							
Broj listova	0,35	0,05	1,00						
Broj nodija	0,21	0,41	0,35	1,00					
Multiplikacija po izdanku	0,03	0,95**	-0,02	0,27	1,00				
Multiplikacija po broju izdanaka	0,82**	0,48	0,21	0,40	0,58	1,00			
Broj internodija	0,19	0,55	-0,40	0,15	0,73*	0,60	1,00		
Dužina internodija	0,21	-0,15	0,50	-0,51	-0,12	-0,02	-0,38	1,00	
Suha tvar	-0,03	-0,43	0,25	-0,58	-0,38	-0,31	-0,54	0,71*	1,00

Legenda:

** vrlo značajna korelacija $p \leq 0,01$ * značajna korelacija $p \leq 0,05$

slaba ili nema korelacije

Korelacijski koeficijent (r) **Jačina korelacije**

0,00 – 0,10

nema

0,10 – 0,25

vrlo slaba

0,25 – 0,40

slaba

0,40 – 0,50

srednja

0,50 – 0,75

jaka

0,75 – 0,90

vrlo jaka

0,90 – 1,00

potpuna

Tablica 27. Značajnost linearnih korelacija između sadržaja hranjivih elemenata u mediju nakon 15 dana kulture.

15 dana	NO ₃	NH ₄	Ca	Mg	K	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	Mo	Si	P	S	B
NO ₃	1,00														
NH ₄	0,64**	1,00													
Ca	0,55**	0,66**	1,00												
Mg	0,69**	0,72**	0,89**	1,00											
K	0,71**	0,69**	0,67**	0,87**	1,00										
Na	0,52*	0,55**	0,42*	0,60**	0,60**	1,00									
Cu	0,75**	0,31	0,14	0,31	0,44*	0,58**	1,00								
Fe	0,54**	0,56**	0,55**	0,63**	0,36	0,71**	0,36	1,00							
Mn	0,51*	0,67**	0,82**	0,86**	0,74**	0,51**	0,05	0,53**	1,00						
Zn	-0,08	-0,07	0,08	0,16	0,37	-0,26	-0,26	-0,51*	0,23	1,00					
Mo	-0,05	-0,31	-0,22	-0,26	-0,11	-0,36	0,09	-0,42*	-0,40	-0,01	1,00				
Si	-0,11	-0,09	-0,44*	-0,42*	-0,38	-0,04	0,03	-0,19	-0,13	-0,20	-0,28	1,00			
P	0,67**	0,39	0,31	0,41*	0,56**	0,21	0,55**	0,22	0,14	-0,11	0,43*	-0,51*	1,00		
S	0,14	0,25	0,45*	0,50*	0,56**	0,04	-0,22	0,03	0,59**	0,75**	-0,39	-0,38	0,02	1,00	
B	0,52*	0,43*	0,69**	0,75**	0,51*	0,67*	0,43*	0,72**	0,49*	-0,22	-0,22	-0,45*	0,36	0,08	1,00

Legenda:

** vrlo značajna korelacija $p \leq 0,01$ * značajna korelacija $p \leq 0,05$

slaba ili nema korelacije

Korelacijski koeficijent (r) **Jačina korelacije**

0,00 – 0,10	nema
0,10 – 0,25	vrlo slaba
0,25 – 0,40	slaba
0,40 – 0,50	srednja
0,50 – 0,75	jaka
0,75 – 0,90	vrlo jaka
0,90 – 1,00	potpuna

Tablica 28. Značajnost linearnih korelacija između sadržaja hranjivih elemenata u mediju nakon 40 dana kulture (kraj ciklusa).

40 dana	<i>NO₃</i>	<i>NH₄</i>	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Zn</i>	<i>Mo</i>	<i>Si</i>	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>B</i>
<i>NO₃</i>	1,00														
<i>NH₄</i>	0,75**	1,00													
<i>Ca</i>	0,56**	0,70**	1,00												
<i>Mg</i>	-0,15	0,18	0,68**	1,00											
<i>K</i>	0,30	0,59**	0,87**	0,81**	1,00										
<i>Na</i>	0,21	0,51*	0,75**	0,66**	0,82**	1,00									
<i>Cu</i>	0,61**	0,61**	0,60**	0,23	0,52*	0,49*	1,00								
<i>Fe</i>	0,75**	0,58**	0,54**	0,01	0,43*	0,40	0,72**	1,00							
<i>Mn</i>	0,31	0,54**	0,92**	0,82**	0,90**	0,86**	0,59**	0,38	1,00						
<i>Zn</i>	-0,36	-0,21	0,30	0,68**	0,47*	0,20	0,13	-0,05	0,44*	1,00					
<i>Mo</i>	-0,22	-0,08	0,37	0,65**	0,64**	0,44**	0,04	0,20	0,46*	0,66**	1,00				
<i>Si</i>	-0,14	-0,13	-0,48*	-0,39	-0,29	-0,13	-0,09	-0,23	-0,37	-0,43*	-0,30	1,00			
<i>P</i>	0,45*	0,69**	0,93**	0,74**	0,97**	0,73**	0,51*	0,50*	0,87**	0,36	0,54**	-0,37	1,00		
<i>S</i>	-0,28	-0,03	0,49*	0,77**	0,59**	0,49**	0,05	-0,12	0,63**	0,81**	0,58**	-0,46*	0,48*	1,00	
<i>B</i>	0,60**	0,55**	0,72**	0,21	0,52*	0,55**	0,43*	0,71**	0,57**	0,03	0,21	-0,60**	0,61**	0,15	1,00

Legenda:

** vrlo značajna korelacija $p \leq 0,01$ * značajna korelacija $p \leq 0,05$

slaba ili nema korelacije

Korelacijski koeficijent (r) **Jačina korelacije**

0,00 – 0,10	nema
0,10 – 0,25	vrlo slaba
0,25 – 0,40	slaba
0,40 – 0,50	srednja
0,50 – 0,75	jaka
0,75 – 0,90	vrlo jaka
0,90 – 1,00	potpuna

Linearnom korelacijskom analizom sadržaja elemenata u biljnom tkivu (Tablica 29.) utvrđena je vrlo jaka i vrlo značajna ($p \leq 0,01$) korelacija pozitivnog smjera između sadržaja magnezija i kalcija ($r = 0,80^{**}$), magnezija i kalija ($r = 0,85^{**}$), magnezija i bakra ($r = 0,86^{**}$), kalcija i bakra ($r = 0,78^{**}$), kalcija i mangana ($r = 0,86^{**}$), mangana i natrija ($r = 0,88^{**}$) te potpuna pozitivna vrlo značajna korelacija između sadržaja kalcija i natrija ($r = 0,92^{**}$) kao i bakra i kalija ($r = 0,91^{**}$). Također utvrđena je i značajno ($p \leq 0,05$) jaka korelacija pozitivnog smjera između sadržaja kalija i kalcija ($r = 0,70^*$), natrija i magnezija ($r = 0,66^*$), natrija i kalija ($r = 0,62^*$), bakra i natrija ($r = 0,69^*$), mangana i magnezija ($r = 0,72^*$), fosfora i kalcija ($r = 0,73^*$), fosfora i natrija ($r = 0,69^*$), fosfora i mangana ($r = 0,66^*$), fosfora i cinka ($r = 0,62^*$), sumpora i mangana ($r = 0,61^*$), te sumpora i cinka ($r = 0,61^*$)

Tablica 29. Značajnost linearnih korelacija između sadržaja hranjivih elemenata u biljnom tkivu.

	Ca	Mg	K	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	Mo	Si	P	S	B
Ca	1,00												
Mg	0,80 ^{**}	1,00											
K	0,70 [*]	0,85 ^{**}	1,00										
Na	0,92 ^{**}	0,66 [*]	0,62 [*]	1,00									
Cu	0,78 ^{**}	0,86 ^{**}	0,91 ^{**}	0,69 [*]	1,00								
Fe	0,34	0,31	0,19	0,10	0,15	1,00							
Mn	0,86 ^{**}	0,72 [*]	0,53	0,88 ^{**}	0,56	0,25	1,00						
Zn	0,45	0,04	-0,04	0,52	0,03	-0,29	0,43	1,00					
Mo	0,47	0,08	0,06	0,47	0,31	-0,16	0,21	0,56	1,00				
Si	0,26	0,29	0,24	0,29	0,35	0,25	0,42	-0,28	-0,20	1,00			
P	0,73 [*]	0,39	0,48	0,69 [*]	0,46	0,15	0,66 [*]	0,62 [*]	0,51	0,05	1,00		
S	0,52	0,32	0,08	0,53	0,04	0,28	0,61 [*]	0,61 [*]	0,12	-0,24	0,45	1,00	
B	0,32	0,31	0,34	0,04	0,29	0,43	0,21	0,11	0,07	0,03	0,62	0,13	1,00

Legenda:

**** vrlo značajna** korelacija $p \leq 0,01$

*** značajna** korelacija $p \leq 0,05$

nema korelacije

Korelacijski koeficijent (r)

Jačina korelacije

0,00 – 0,10

nema

0,10 – 0,25

vrlo slaba

0,25 – 0,40

slaba

0,40 – 0,50

srednja

0,50 – 0,75

jaka

0,75 – 0,90

vrlo jaka

0,90 – 1,00

potpuna

Linearnom korelacijskom analizom fiziološko-biokemijskih parametara u biljnom tkivu (Tablica 30.) utvrđena je vrlo jaka i vrlo značajna ($p \leq 0,01$) korelacija pozitivnog smjera između sadržaja fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ($r = 0,75^{**}$).

Tablica 30. Značajnost linearnih korelacija između fiziološko-biokemijskih pokazatelja reakcije biljaka (sadržaju ukupnih topljivih fenola *PHE*, ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti *UAA*, koncentraciji produkata lipidne peroksidacije *LPO* i askorbinske kiseline *AA*) u biljnom tkivu.

	<i>PHE</i>	<i>UAA</i>	<i>LPO</i>	<i>AA</i>
<i>PHE</i>	1,00			
<i>UAA</i>	0,75**	1,00		
<i>LPO</i>	0,07	-0,20	1,00	
<i>AA</i>	0,34	0,15	0,25	1,00

Legenda:

** vrlo značajna korelacija $p \leq 0,01$

nema korelacije

Korelacijski koeficijent (r)

Jačina korelacije

0,00 – 0,10

nema

0,10 – 0,25

vrlo slaba

0,25 – 0,40

slaba

0,40 – 0,50

srednja

0,50 – 0,75

jaka

0,75 – 0,90

vrlo jaka

0,90 – 1,00

potpuna

4. RASPRAVA

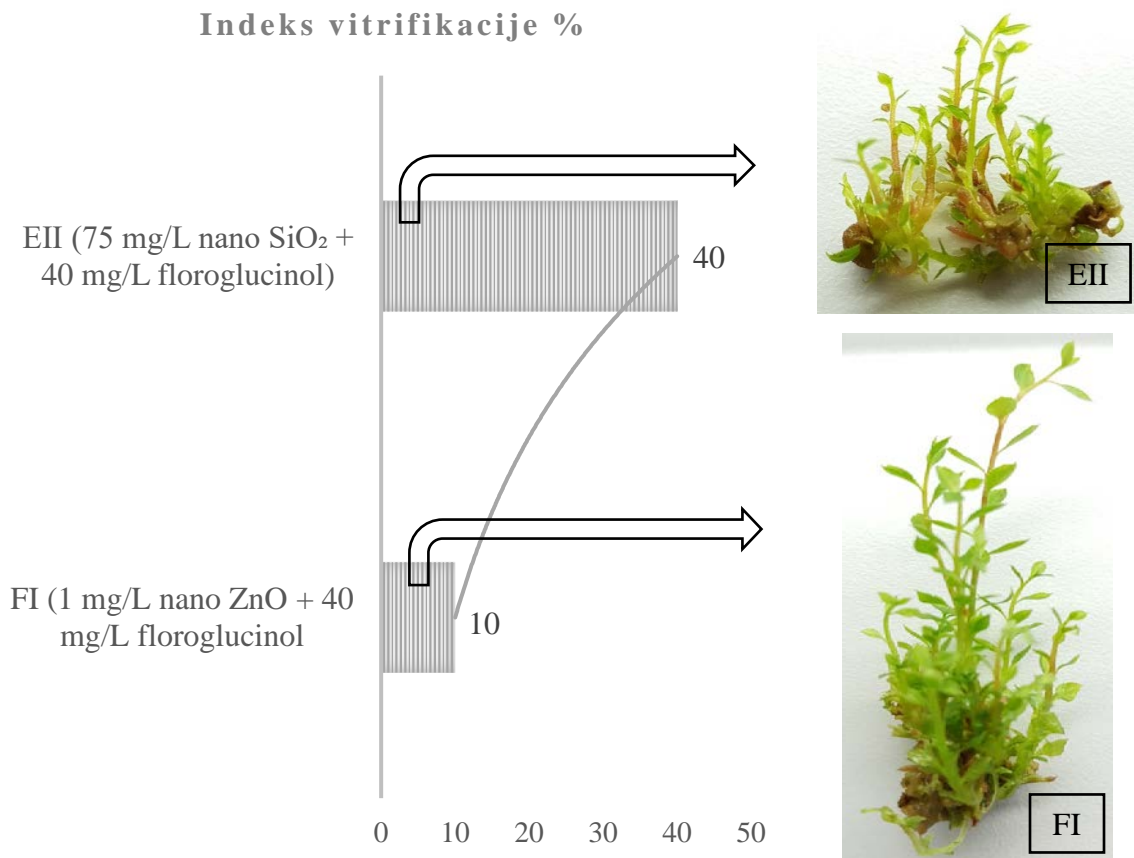
Moderna znanstveno-istraživačka praksa razvijenih članica Europske unije temelji se dijelom ili u potpunosti na uporabi suvremenih biotehnoloških metoda (mikropropagacija, kultura tkiva *in vitro*). Konvencionalni *in vitro* model mikropropagacije ograničen je uporabom čvrstih ili polučvrstih medija, odnosno agara koji poskupljuje proizvodnju u odnosu na suvremeni imerzni sustav bioreaktora. SETISTM sustav imerznih bioreaktora pogodan je zbog svoje modularnosti te se pokazao uspješnim u mikropropagaciji brojnih kultura. Međutim, kao mlada tehnologija zahtjeva daljnja istraživanja u svrhu optimizacije protokola za pojedine biljne vrste i njihove kultivare (**Bošnjak i sur., 2021.**). Jedan od osnovnih problema reprodukcije u ovakvim sustavima je učestala pojava vitrifikacije ili hiperhidriranosti biljnog materijala. Upotreba nanotehnologije, nanočestica i biljnih stimulatora nameće se kao potencijalno rješenje u prevladavanju stresnih uvjeta uzrokovanih vitrifikacijom.

4.1. Intenzitet vitrifikacije izdanaka i anatomske značajke listova borovnice u TIB/TIS sustavu

Krajem kultivacijskog perioda kod svih je tretmana uspješno dobivena potrebna biomasa biljaka borovnice, bez prisutnih simptoma kontaminacije, dostatna za provedbu svih potrebnih analiza. S obzirom na definiran sastav i volumen hranjive podloge određeni su intervali potrebnog vremena imerzije i aeracije, uz dodatno obogaćivanje mikroatmosfera bioreaktora s CO₂ (1000 ppm u svijetloj fazi), čime su u potpunosti zadovoljeni fotomiksotrofni uvjeti potrebni za regeneraciju biljnog tkiva. Brzina aktiviranja autonomnog fotoautotrofnog metabolizma ključ je za produkciju kvalitetne biomase te skraćivanje kultivacijskog perioda (**Bošnjak i sur., 2021.**).

U istraživanju su utvrđene značajne razlike u indeksu vitrifikacije između primijenjenih tretmana (Grafikon 21.). Hiperhidrirane, vitrificirane biljke imaju staklast izgled, krhke stabljike i listove koji su prozirni uslijed nedostatka klorofila, dužina internodija im je reducirana, a tkivo hipolignificirano s povećanim međustaničnim prostorima (**Gaspar i Kevers, 1985.**). Na kraju kultivacijskog perioda utvrđen je visok indeks vitrifikacije (40 %) kod tretmana s obje kombinacije nano-SiO₂ s floroglucinolom (EI i EII), tretmana višom koncentracijom floroglucinola (DII) te kontrolnog tretmana (K).

Kod tretmana koji su uključivali primjenu obje koncentracije nano-ZnO (CI i CII) i tretmana s kombinacijom više koncentracije nano-ZnO i floroglucinola (FII) utvrđen je indeks vitrifikacije od 30 %. Niži stupanj vitrifikacije od 20 % zabilježen je pri tretmanima BI i BII koji su sadržavali nano-SiO₂ te kod tretmana nižom koncentracijom floroglucinola (DI).

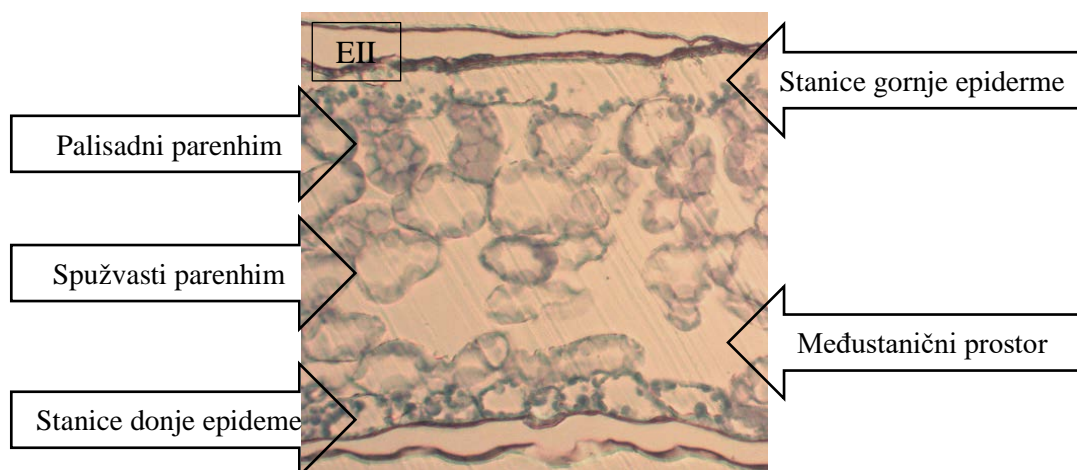


Grafikon 21. Indeks vitrifikacije (%) kod tretmana EII i tretmana FI (vizualna opažanja),
(Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Najniži indeks vitrifikacije s vrijednošću od 10 % (Grafikon 21.), utvrđen je kod tretmana FI koji je uključivao kombinaciju niže koncentracije nano-ZnO i floroglucinola (1 mg/L nano-ZnO + 40 mg/L floroglucinol). Rezultati su pokazali da obje primijenjene kombinacije nano-SiO₂ s floroglucinolom (EI i EII) nisu imale povoljan učinak na smanjenje indeksa vitrifikacije, kao ni tretman višom koncentracijom floroglucinola (DII) te su vrijednosti bile slične kontrolnom tretmanu (40 %). **Gao i sur. (2020)** utvrdili su visok postotak vitrifikacije (80 do 100 %) nakon primjene biljnog regulatora polietilen-glikola (PEG-6000 od 10, 30 i 50 mg/L) kod vrste *Dendrobium officinale*. Floroglucinol kao biljni regulator primijenjen u našem istraživanju povoljno je utjecao na smanjenje vitrifikacije te

rezultirao nižim vrijednostima indeksa vitrifikacije od 20 % (DI – 40 mg/L) i u kombinaciji s nanočesticama ZnO, s vrijednošću od 10 % (FI), te 30 % (FII).

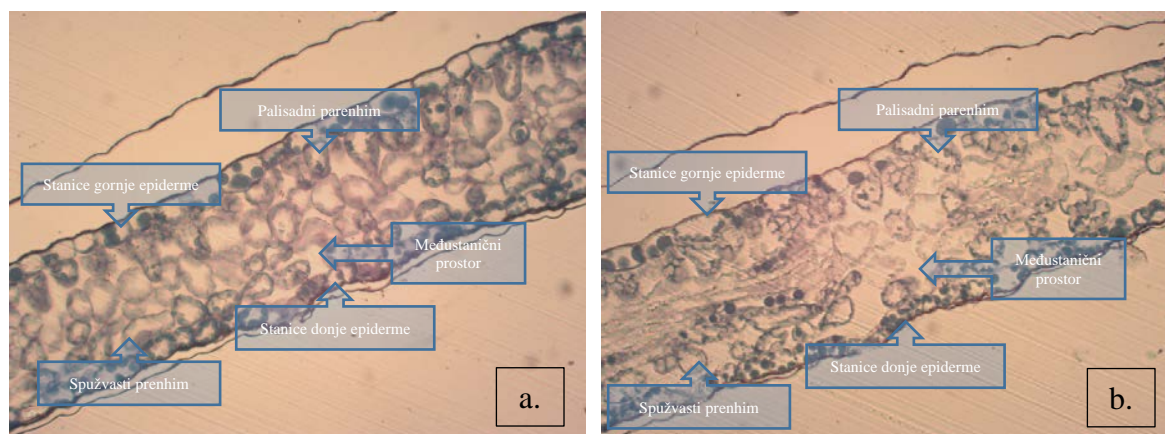
Thomas i sur. (2000.) su u istraživanju mikropropagacije lubenice (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) u normalnim uvjetima prema konvencionalnom modelu u zatvorenoj teglici bez aeracije utvrdili postotak vitrificiranosti izdanaka od 35 %. Vrijednosti indeksa vitrifikacije dobivene u našem istraživanju (10 do 30 %) uvelike su niže te idu u prilog učinkovitosti imerznog sustava, ali i primjene navedenih nanočestica Si i Zn te floroglucinola u supresiji nastanka hiperhidriranih izdanaka borovnice. Hiperhidrirane biljke pokazuju niz anatomskih promjena lista koje uključuju nepravilnosti u razvoju epiderme i kutikule, distribuciji i broju puči te povećanje međustaničnog prostora u mezofilu (**Saher i sur. 2004.; Chakrabarty i sur. 2006.; van den Dries i sur. 2013.; Gao i sur. 2017.**). S fiziološkog gledišta hiperhidrirane biljke odlikuje smanjen sadržaj klorofila te visok sadržaj vode (**Kevers i sur. 1987; Olmos i Hellín 1998**). To potvrđuje i analiza poprečnog presjeka lista te analiza puči u našem istraživanju. Kod kontrolnog tretmana K, kao i tretmana EI, EII i DII koji su rezultirali najvišim indeksom vitrifikacije (40 %), vidljivo je veliko odstupanje od pravilnog rasporeda, ali i same građe palisadnog i spužvastog parenhima koji je imao neuobičajeno velike međustanične prostore (Slika 23), a utvrđen je i manji broj puči po površini epiderme lista na pojedinim tretmanima (Tablica 6.).



Slika 23. Nepravilan razvoj listnog staničja kod tretmana EII (75 mg/L nano SiO₂ + 40 mg/L floroglucinol), (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Promjene u strukturi tkiva i stanica lista uzrokovane vitrifikacijom mogle bi biti osnova za predviđanje i prevenciju vitrifikacije. Slabije hiperhidrirane (FI i DI, Slika 24a.) i

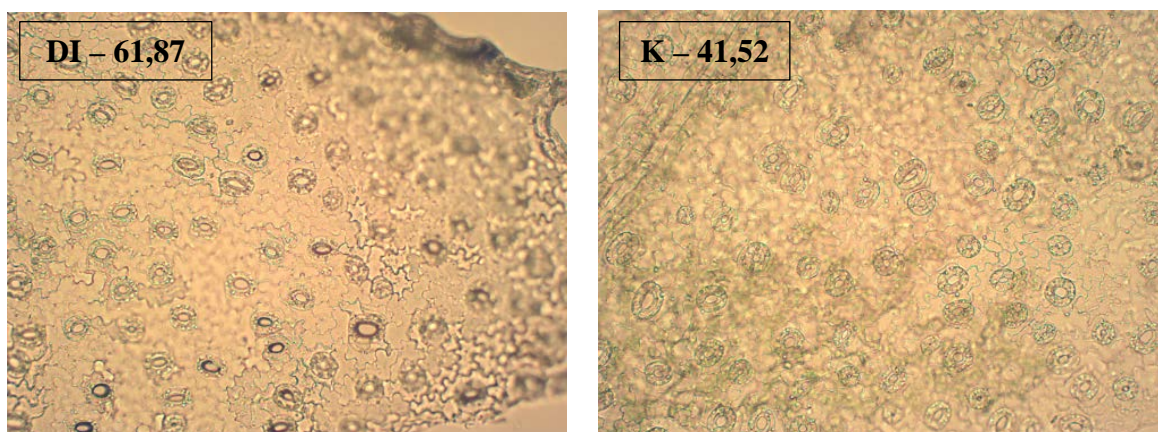
hiperhidrirane biljke (EI, EII, DII i K, Slika 24b.) pokazale su međusobnu razliku u strukturi i rasporedu stanica mezofila lista.



Slika 24. Poprečni prerez lista slabije hiperhidriranih (a.) i hiperhidriranih biljaka (b.), (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

U našem istraživanju utvrđene su značajne razlike u broju puči po površini epiderme listova biljaka tretiranih nanočesticama i floroglucinolom u odnosu na kontrolne biljke, no nije bilo značajnih razlika u veličini puči i otvoru porusa. U epidermi listova biljaka tretiranih česticama nano-SiO₂ (BI – 30 mg/L i BII – 75 mg/L) utvrđen je značajno manji broj puči u odnosu na kontrolu i ostale primijenjene tretmane (Slika 25.). Kod svih ostalih tretmana (CI, CII, DI, DII, EI, EII, FI i FII) utvrđen je značajno veći broj puči po površini epiderme lista u odnosu na listove kontrolnih biljaka (Slika 25). U skladu s našim istraživanjem, **Nikam i sur. (2019.)** su utvrdili da vitrificirani listovi agave (*Agave sisalana* Perr. ex Engelm) imaju značajno manji broj puči u odnosu na nevitificirane listove. Najveći broj puči zabilježen je u epidermi listova borovnice tretiranih floroglucinolom (DI – 40 mg/L i DII – 80 mg/L) koji je bio značajno veći u odnosu na sve ostale tretmane (Slika 25. i Tablica 6.). Istraživanje **Phana i Hegedusa (1986.)** pokazalo je da floroglucinol aktivira sintezu enzima p-kumarat:CoA ligaze vezanog uz proces lignifikacije te posljedično utječe i na povećanje broja puči. Usljed većeg broja puči bolja je i izmjena plinova, vode i drugih hranjivih tvari. U kulturi tkiva puči su uvijek otvorene na dijelu eksplantata ili biljke izložene plinovitoj fazi (**De Klerk i Wijnhoven, 2005.**), ali također i na tkivima koja su izložena polučvrstom ili tekućem mediju. I usvajanje putem puči vrlo je moguće. Biljke uzgajanje *in vitro* u pojedinim fazama razvoja većinom nemaju korijen i uzgajaju se u atmosferi koja je vrlo vlažna, a vodni potencijal u biljci je reduciran. Usprkos tome u kulturi tkiva još uvijek postoji dovoljan protok vode

(Beruto i sur., 1999.) čemu pogoduju puči koje su stalno otvorene (De Klerk i Wijnhoven, 2005.).



Slika 25. Gustoća puči u epidermi listova borovnice kod tretmana DI (40 mg/L floroglucinol; 61,97) te kontrolnog tretmana (K; 41,52), (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Uslijed abnormalnih stanja kao što su hipertrofija ili deformacija puči, Si utječe na održavanje njihove strukture (Asmar i sur., 2013.; Manivannan i sur., 2016.). U našem istraživanju nije bilo razlike u broju puči kod biljaka tretiranih nižom (30 mg/L – BI) i višom (75 mg/L – BII) koncentracijom nano-SiO₂, ali ni odstupanja u dimenzijama puči između svih ostalih primijenjenih tretmana i kontrole. Soundararajan i sur. (2017.) su kod vitrificiranih biljaka karanfila (*Dianthus caryophyllus* L.) uzgajanih u TIB/TIS sustavu utvrdili deformacije puči kod kontrolnog tretmana, ali i pozitivni utjecaj više koncentracije nano-SiO₂ na povećanje broja puči u epidermi listova. Primjena Si u obliku CaSiO₃ na biljkama banane (*Musa sp.*, cv. Macã’ (Silk) banana) i listovima obične (*Brassavola perrinii* Lindl.) i hibridne orhideje ((*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons AtoutRotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach) povećava broj puči adaksijalno i abaksijalno (Asmar i sur., 2013.; Soares i sur., 2012.). U našem istraživanju tretmani s nano-SiO₂ (BI i B II) nisu utjecali na povećanje broja puči u odnosu na kontrolu (Tablica 6.). Istraživanja Zargara i Agnihotria (2013.) na biljkama kukuruza (*Zea mays* L.) također nisu utvrdila razlike u broju puči između kontrolnog tretmana i tretmana silicijem u obliku Ca₂SiO₄. Gao i sur., (2006.) su zaključili kako silicij primijenjen u obliku silikatne kiseline (H₄SiO₄) ne utječe na morfološke osobine i broj puči u epidermi listova kukuruza, ali pretpostavljaju da ima važnu ulogu u smanjenju transpiracije tako što utječe na brzinu otvaranja i zatvaranja puči. Oba tretmana kombinacije nano-SiO₂ i floroglucinola (EI i EII) u našem istraživanju rezultirala su značajno većim brojem puči u odnosu na pojedinačne

tretmane s nano-SiO₂ (BI i BII). Ovi rezultati upućuju da floroglucinol sam i/ili u kombinaciji (sinergiji) s nanočesticama utječe na povećanje broja puči u epidermi listova borovnice.

Tretmani koji su uključivali primjenu nano-ZnO u obje koncentracije (1 mg/L CI i 10 mg/L CII) rezultirali su značajno većim brojem puči u odnosu na kontrolni tretman i tretmane s nano-SiO₂ (BI i BII). **Salehi i sur., (2021.)** su u istraživanju na biljkama graha (*Phaseolus vulgaris* L.) utvrdili negativne učinke folijarne primjene viših koncentracija nano-ZnO (1000 do 2000 mg/L) na broj puči, dok su koncentracije nano-ZnO od 250 i 500 mg/L rezultirale značajno većim brojem puči u odnosu na netretirane biljke. U našem istraživanju viša koncentracija nano-ZnO (10 mg/L; tretman CII) rezultirala je značajno većim brojem puči u odnosu na nižu koncentraciju od 1 mg/L kod tretmana CI. Suprotno tome, istraživanja koja su uz primjenu različitih spojeva cinka proveli **Mattiello i sur. (2015.)** na kukuruzu (*Zea mays* L., ZnSO₄), **Ojeda-Barríos i sur. (2012.)** na pekan orahu (*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch, Zn-DTPA), **Hezaveh i sur. (2019.)** na uljanoj repici (*Brassica napus* L., nano-ZnO) te **Rajput i sur. (2021.)** na ječmu (*Hordeum sativum* L., nano-ZnO) pokazala su da kontrolne biljke u nedostatku cinka imaju značajno veći broj puči u epidermi lista.

Usljed vitifikacije, akumulacija vode u međustanični prostor i substomatalne šupljine uzrokuje zatvaranje puči (**Sibbersen i Mott, 2010.**) i ometa signal kojim mezofil potiče reakciju puči na promjene u intenzitetu svjetlosti i koncentraciji CO₂ (**Mott i sur., 2008.**). Takvo hipertrofično stanje inhibira funkciju puči (**Allen i sur., 2001.**), a zatvaranje puči istodobno dovodi i do zadržavanja vode u apoplastu, nepravilnosti u procesu izmjene plinova te posljedično do stvaranja osmotskog i oksidativnog stresa. U našem istraživanju je tijekom analize puči uočen vrlo mali broj zatvorenih puči, a iste su izuzete iz daljnjih analiza.

4.2. Rast i razvoj (produktivnost) izdanaka borovnice u TIB/TIS sustavu

Usljed tretmana FI koji je uključivao primjenu kombinacije niže koncentracije nano-ZnO (1 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L) te kod tretmana DI s nižom koncentracijom floroglucinola (40 mg/L) biljke borovnice imale su značajno veće izdanke, a time i multiplikaciju po izdanku u odnosu na ostale tretmane i kontrolu (Slika 20. i 26.). Prema **Siddiqui i sur. (2015.)** nano-ZnO djeluje stimulatивно na rast i razvoj biljaka, a učinak varira ovisno o genotipu. Primjerice, niže koncentracije nano-ZnO imaju povoljan učinak na germinaciju sjemena kikirikija (*Arachis hypogaea* L., **Prasad i sur., 2012.**), soje (*Glycine*

max L., **Sedghi i sur., 2013.**) i pšenice (*Triticum aestivum* L., **Ramesh i sur., 2014.**) te na produkciju biomase, rast izdanaka i korijena biljke *Cyamopsis tetragonoloba* (**Raliya i Tarafdar, 2013.**). **Gururaj i sur. (2004.)** navode da floriglucinol pospješuje biosintezu lignina i tako kontrolira vitrifikaciju te poboljšava multiplikaciju izdanaka indijske endemične grmolike vrste *Decalepis hamiltonii* što je također u skladu s našim rezultatima istraživanja. Međutim, broj izdanaka kod tretmana FI i DI bio je značajno manji u odnosu na kontrolni tretman te je ujedno i multiplikacija po broju izdanaka bila najniža (Tablica 4.). Također, broj listova i nodija kod tretmana FI bio je značajno veći u odnosu na kontrolu te većinu ostalih tretmana (BI, BII, CI, CII, DI, DII i EI) u istraživanju. **Ross i Castilo (2009.)** utvrdili su pozitivni učinak floriglucinola u multiplikaciji izdanaka borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) upravo pri koncentraciji od 40 mg/L što je potvrđeno i u našem istraživanju. Dodatak floriglucinola (40 mg/L) u kombinaciji s nižom koncentracijom nano-ZnO (1 mg/L) u hranjivi medij osim utjecaja na smanjenje vitrifikacije biljnog materijala (indeks vitrifikacije kod tretmana FI iznosio je 10 %) uvelike je utjecao i na elongaciju, odnosno izduživanje izdanaka te posljedično i na povećanje multiplikacije po izdanku, kao i na povećanje broja listova i nodija u odnosu na kontrolni tretman (Slika 26.). Slične rezultate pozitivnog utjecaja nižih koncentracija nano-ZnO na *in vitro* morfološke parametre (biomasa, proliferacija, dužina izdanaka) kod dva različita kultivara nara (*Punica granatum* L.) iznose **El-Mahdy i Elazab (2020.)**, gorušice (*Brassica nigra* L.) **Zafar i sur. (2016.)** te mandarine (*Citrus reticulata* L.) **Hussain i sur. (2017.)**. **Zafar i sur. (2016.)** su utvrdili da koncentracija nano-ZnO (10 mg/L) stimulatивно utječe na diferencijaciju kalusa na izdancima gorušice, odnosno da je povećanje koncentracije nano-ZnO u pozitivnoj korelaciji s produkcijom korijenja, a u negativnoj korelaciji s produkcijom biomase (inhibitorni učinak). Suprotno tome, u našem istraživanju uočen je pozitivni utjecaj više koncentracije nano-ZnO (10 mg/L; CII) na produkciju biomase (veličina i broj izdanaka, broj listova, dužina internodija i multiplikacija) u odnosu na nižu koncentraciju nano-ZnO od 1 mg/L (BI).



Slika 26. Analiza kvalitete morfoloških parametara izdanaka borovnice po primijenjenim tretmanima FI i K (Foto: D. Bošnjak, 2021.)

Floroglucinol predstavlja fenolni spoj koji se često koristi u kulturi tkiva kao dodatak regulatoru rasta zbog njegovog stimulativnog utjecaja na aktivnost stanica te regenerativna svojstva (**Teixeira da Silva i sur., 2013.; Aremu i sur., 2015.**). Dodavanje floroglucinola u hranjivi medij može značajno poboljšati kvalitetu i fiziološki status *in vitro* biljaka. Tretman floroglucinolom poboljšava morfološke osobine lukovica biljke *Eucomis autumnalis*, a uočeni stimulativni učinak na podzemne organe pripisuje se tzv. „neauksinskom“ ili „necitokininskom“ djelovanju floroglucinola (**Aremu i sur., 2015.**). Ovaj fenolni spoj štiti od oksidacije, osobito auksina koji ima važnu ulogu u procesu razvoja korijena (**De Klerk i sur., 2011.**). U našem istraživanju, viša koncentracija floroglucinola (80 mg/L; DII) negativno je utjecala na produkciju biljne mase te je rezultirala vitrifikacijom i smanjenjem veličine izdanaka biljaka borovnice. Također, u usporedbi s kontrolnim tretmanom, tretmani floroglucinolom (DI i DII) nisu rezultirali poboljšanom produkcijom biomase (broj izdanaka i listova, multiplikacija), kako navode **Aremu i sur. (2015.)**. Niža koncentracija floroglucinola (40 mg/L; tretman DI) potaknula je razvoj značajno većih izdanaka u odnosu na kontrolne biljke i tretman višom koncentracijom floroglucinola (DII). Kombinacije nano-SiO₂ i više koncentracije ZnO s floroglucinolom (EI, EII i FII) također nisu rezultirale očekivanim poboljšanjem produkcije izdanaka te multiplikacijom u odnosu na kontrolni tretman. Navedeni tretmani rezultirali su manjim brojem i veličinom izdanaka, odnosno multiplikacijom po izdanku i brojem izdanaka u odnosu na kontrolni tretman (Tablica 4.). **El-Mahdy i Elazab (2020.)** također iznose negativne učinke viših koncentracija nano-ZnO (10 mg/L) na morfološke parametre (proliferacija, dužina izdanaka i biomasa) kod dvaju kultivara nara uzgajanih *in vitro*. Pojedina istraživanja iznose da djelovanje Zn na biljke ovisi prvenstveno o primijenjenoj koncentraciji te da se pri višim koncentracijama Zn akumulira u tkivu i uzrokuje fitotoksičnost te posljedično ograničava rast biljnog tkiva (**Longnecker i sur., 1993.; Cakmak, 2000; Khudsar i sur., 2004.**). Floroglucinol u kombinaciji s manjom dozom nano-ZnO (tretman FI) u našem istraživanju rezultirao je učinkovitom kontrolom vitrifikacije (10 %), razvojem najviših izdanaka, višom stopom multiplikacije izdanaka, razvojem karakterističnog staničja mezofila lista bez velikih međustaničnih prostora te boljom kvalitetom biljnog materijala (biomasa i vigor). Koristeći podjednake koncentracije, **Zafar i sur. (2016.)** su na biljkama crne gorušice utvrdili kako koncentracija nano-ZnO od 10 mg/L uzrokuje smanjenje biomase. Slične rezultate utvrdili su **Hussain i sur. (2017.)**, koji su pokazali da jedino niska koncentracija nano-ZnO u MS hranjivom mediju učinkovito stimulira germinaciju sjemenki mandarine *in vitro*. Nadalje, niže koncentracije (1 do 1,5

mg/L) nano-ZnO pospješile su stvaranje biomase biljaka slanutka (*Cicer arietinum* L. var. HC-1) dok su visoke koncentracije djelovale toksično (Burman i sur., 2013.).

U našem istraživanju, više koncentracije nano-SiO₂ (BII i EII) nisu utjecale negativno na razvoj eksplantata i biljaka borovnice te su analizirani morfološki parametri bili u skladu s kontrolnim tretmanom, ali bez promjena u dimenzijama puči. Vrijednosti morfoloških parametara i dimenzija puči i nakon tretmana nižom koncentracijom nano-SiO₂ također su bile na razini kontrolnog tretmana. Jedino je pri kombinaciji niže koncentracije nano-SiO₂ i floroglucinola (EI) zabilježena značajno manja produkcija izdanaka u odnosu na kontrolni tretman. Suprotno tome, Soundararajan i sur. (2015.) dokazali su negativan učinak viših koncentracije Si (K₂SO₃) na *in vitro* rast i razvoj eksplantata karanfila (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Tula). Negativan učinak viših koncentracija različitih oblika Si zabilježen je i kod drugih kultura kao što su riža (SiO₂ na *Oryza sativa* L.; Agarie i sur., 1998.), crni grah (Na₂SiO₃ na *Vigna unguiculata* L.; Mali i Aery, 2008.) i cherry rajčica (nano-SiO₂ na *Solanum lycopersicum* L.; Haghghi i Pessarakli, 2013.). Prema Yeo i sur. (1999.) velika sedimentacija Si uzrokuje silifikaciju stanične stjenke u ranoj fazi elongacije stanica. Deformacije uslijed taloženja i akumulacije Si u i oko trihoma (Montpetit i sur., 2012.), puči (Zuccarini, 2008.) i staničnih stjenki (Agarie i sur., 1998.) mogu rezultirati manjim postotkom uspješnosti *in vitro* uzgoja. Si se taloži u fotosintetski aktivnim tkivima (Ma i Yamaji, 2008.; Schaller i sur., 2012.) gdje sprječava gubitak vode putem puči te u konačnici smanjuje transpiraciju (Meinzer i sur., 1990.).

4.3. Stabilnost hranjivog medija i bioakumulacija elemenata mineralne ishrane u izdancima borovnice

Početni status hranjivog medija utvrđen je primarnom analizom sadržaja pojedinih mikro- i makroelemenata nakon autoklaviranja (start – 0-ti dan). Opažena varijabilnost koncentracija između tretmana, izrazito malog odstupanja (nekoliko miligrama po litri), nije utjecala na daljnju evaluaciju rezultata. Obrazloženje ove pojave nalazi se u sastavu gotovog hranjivog WPM medija (Lloyd i McCown, 1981.) renomiranog proizvođača Duchefa Biochemie (Nizozemska). Pretpostavka je da prilikom vaganja hranjivog medija omjer hranjivih mikro- i makroelemenata u praškastoj masi nije idealan te su moguća mala odstupanja od navedene koncentracije pojedinih elemenata koja se kasnije očituju u samim elementarnim analizama uzorka hranjivog medija. Ovakva mala odstupanja od navedene koncentracije pojedinih elemenata nemaju značajan učinak na rast i razvoj eksplantata

tijekom kultivacije. Kod većine tretmana nakon 15 dana koncentracija mineralnih tvari se ujednačila, iako su postojala značajna odstupanja u koncentraciji elemenata (na početku istraživanja (0-ti dan, nakon autoklaviranja).

Analizom hranjivog medija kroz kultivacijski period zabilježene su oscilacije u dinamici koncentracija nitratnog oblika dušika (Grafikon 2.). Tako se kroz 15 dana kulture razina NO_3 u hranjivom mediju na svim tretmanima smanjila za prosječno 46,7 %, a nakon 40 dana se opet povećala na 80,9 % početne koncentracije. Dušik je neophodan za život biljaka. Sastavni je dio proteina, nukleinskih kiselina i klorofila (**George i sur., 2008.**). Pretpostavljamo da je uslijed progresije rasta i razvoja biljnog materijala (porast intenziteta metabolizma) tijekom početnih 15 dana kulture došlo do povećanog usvajanja nitratnog oblika dušika potrebnog za stvaranje vegetativne mase. Također nije uočena značajna razlika između tretmana u sadržaju amonijskog oblika dušika (NH_4) na početku (0-ti dan) i nakon 15 dana kulture. Na kraju ciklusa (40 dana) kod većine tretmana razina je ostala ujednačena, a jedino odstupanje zabilježeno je kod tretmana EI (30 mg/L nano- SiO_2 + 40 mg/L floroglucinola) gdje je utvrđena značajno viša koncentracija NH_4 u odnosu na ostale tretmane, osim tretmana DI (40 mg/L floroglucinola). Sadržaj NH_4 nakon 15 dana kulture smanjio se za 51,2 %, a na kraju ciklusa za 87,6 % (Grafikon 3.).

Nakon usvajanja te prije same ugradnje u organsku molekulu, NO_3 se reducira u NH_4 . Rast i morfogeneza u kulturi tkiva pod znatnim je utjecajem dostupnog oblika dušika. Biljke koriste reducirani oblik dušika (NH_4) za svoj metabolizam. Većina hranjivih medija sadrži višu koncentraciju nitratnog oblika dušika u odnosu na amonijski. Usvajanje nitrata učinkovito je samo pri kiselom pH te je popraćeno istiskivanjem aniona, što posljedično dovodi do povećanja pH vrijednosti (**George i sur., 2008.**). Suprotno tome, usvajanje amonijskog oblika rezultira izlučivanjem protona vodika (H^+) u medij koji posljedično snižava pH vrijednost. Izmjena iona održava balansni naboj tkiva te može utjecati na odlaganje viška protona (H^+) ili hidroksilnih iona (OH^-) nastalih tijekom metabolizma (**Raven, 1986**). U kulturi tkiva postoji bliska korelacija između usvajanja dušika, rasta stanica i pretvorbe dušika u organsku tvar (**George i sur., 2008.**).

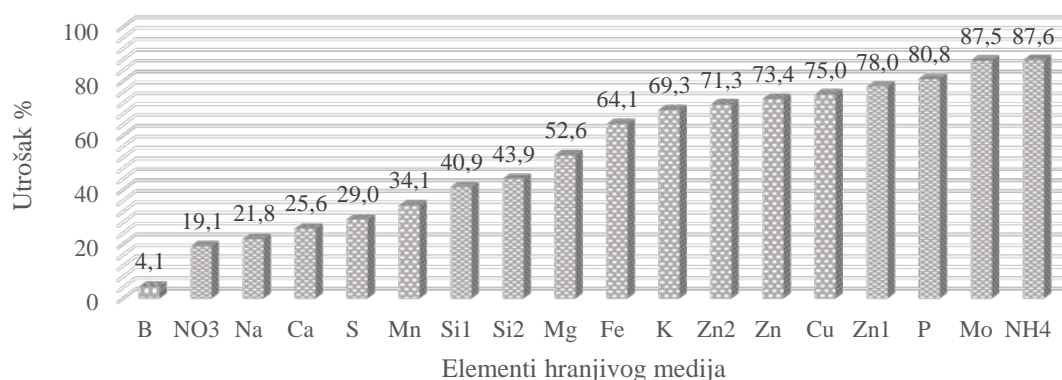
Prema **Georgeu i sur. (2008.)** medij za kulturu tkiva obično se podešava na pH 5,4 do 5,8 te sadrži oba oblika dušika (nitratni i amonijski). Brzo usvajanje amonijskog oblika u biljno tkivo na početku kulture posljedično uzrokuje smanjenje pH vrijednosti na oko 4,2 do 4,6. To se obično vrlo negativno odražava na fiziološki status eksplantata brojnih kultura tijekom kultivacije, posebice na tekućem hranjivom mediju. Stoga je za *in vitro* kulture koje

zahtijevaju viši pH poželjno izvršiti redukciju dodanog NH_4 , ali i šećera. Također, specifičnost uzgoja na tekućem hranjivom mediju, kao interventnu mjeru, nudi mogućnost izmjene medija, subkultivaciju. Progresijom rasta i povećanjem metabolizma biljke, daljnje usvajanje amonijaka je inhibirano, ali se aktivira usvajanje nitratnog oblika koji uzrokuje ponovno povećanje pH vrijednosti medija (George i sur., 2008.). Naši su rezultati u skladu s ovim istraživanjima te je vidljiva degradacija amonijskog i nitratnog oblika dušika tijekom prvih 15 dana i ponovni porast koncentracije nitratnog oblika nakon 15 dana (Grafikon 2. i 3.). Ujedno je pH, ali i EC vrijednost medija u našem istraživanju imala blagi pad tijekom kultivacije. Pretpostavljamo kako je ova dinamika doprinijela dodatnom usvajanju amonijskog oblika u prvim danima kulture (pH 5,0 do 5,3) te nitratnog oblika pred kraj ciklusa (pH 4,5 do 5,0), kada je amonijski oblik gotovo u potpunosti utrošen (Grafikon 22. i 24.)

U našem je istraživanju došlo do smanjenja koncentracije pojedinih mineralnih komponenti hranjivog medija tijekom kultivacije. Tijekom cijelog pokusa je smanjenje koncentracije bilo linearno za sljedeće elemente: Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Si i P.

Smanjenje koncentracije elemenata Na, S i B nije bilo linearno te je zabilježeno malo povećanje u njihovoj koncentraciji nakon 15 dana kulture te ponovno smanjenje vrijednosti na kraju ciklusa (40 dan).

Kao što je vidljivo iz grafikona 22. na kraju kulture je iz tekućeg hranjivog medija utrošeno najviše amonijskog oblika dušika (87,6 %), molibdena (87,5 %), fosfora (80,08 %), cinka (Zn – 78 %, Zn 1 – 73,4 % i Zn 2 - 71,3 %), bakra (75 %), kalija (69,3 %), željeza (64,1 %) te nešto više od polovice magnezija (52,6 %). Od ostalih elemenata, utrošeno je 43,9 % i 40,9 % dodanog silicija (Si 2 i Si 1) te mangana (34,1 %), sumpora (29 %), kalcija (25,6 %), natrija (21,8 %), nitratnog oblika dušika (19,1 %) i svega 4,1 % bora.



Grafikon 22. Prosječni utrošak elemenata hranjivog medija (%) na kraju kultivacijskog perioda

U ovom istraživanju zabilježen je neznatni porast koncentracije Si u odnosu na početnu vrijednost na kraju ciklusa (40 dana) prosječno za sve tretmane koji nisu uključivali primjenu nanočestica-SiO₂ (K, CI, CII, DI, DII, FI i FII – Si standard). Usporedivši dinamiku kretanja koncentracije Si kod svih tretmana (Grafikoni 14.,15. i Grafikon 22.) može se zaključiti kako se dodani Si ipak usvaja. Pretpostavljamo da se uslijed pojavnosti rezidua elementa Si nastalog iz sustava (silikonske cijevi za hranjivi medij i plastična izvedba komora za rast bioreaktora) dogodilo neznatno povećanje u koncentraciji ovog elementa na kraju ciklusa u tretmanima bez Si te da isti nije utjecao na daljnji proces rasta biljnog materijala i evaluaciju pokusa. Si je inertan i nije topljiv te dolazi do svojevrstne sedimentacije, odnosno taloženja na dno posude tijekom kulture uslijed čega je i izmjerena niža vrijednost od dodanih koncentracija (30 i 75 mg/L).

Nisu utvrđena značajna odstupanja između tretmana u akumulaciji, odnosno sadržaju mineralnih elemenata u biljnom tkivu za sljedeće elemente: Ca, Mg, K, Na, Fe, Mn, Mo, P i S. Jedine razlike u stupnju akumulacije zabilježene su za Cu, Zn, Si i B.

Kod kontrolnog tretmana izmjerena je značajno viša koncentracija Cu u odnosu na ostale tretmane, dok su koncentracije Zn u tkivu biljaka bile u pozitivnoj korelaciji s tretmanima Zn u mediju gdje je apliciran u višoj koncentraciji od 10 mg/L (CII i FII). Cu je esencijalni mikroelement te ga biljke sadrže u koncentracijama od svega nekoliko ppm-a, a pri višim koncentracijama može biti toksičan. Veže se za enzime koji se vežu ili reagiraju s kisikom te uključuje enzimske sustave vezane za stanično disanje i enzim superoksid-dismutazu. Koncentracija Cu u hranjivom mediju vrlo je niska (0,1 do 1,0 μ M) u usporedbi s koncentracijom u tkivu biljke te se vrlo često iznose pozitivni učinci primjene viših koncentracija Cu (1,0 do 5,0 μ M) *in vitro* (Dahleen, 1995.; Nirwan i Kothari, 2003.; Kintzios i sur., 2001.; Nas i Read, 2004.; Bouman i Tiekstra, 2005.).

U okviru ovog istraživanja tretmani koji su uključivali primjenu floroglucinola (DI i DII), ali i kombinaciju floroglucinola i niže koncentracije nano-ZnO od 1 mg/L (FI) rezultirali su manjim usvajanjem Si od ostalih tretmana i kontrole. S obzirom na gore navedene rezultate pretpostavljamo da floroglucinol ima antagonistični učinak u usvajanju silicija. Si pokazuje pozitivan učinak na rast biljaka ublažavajući stresna stanja uzrokovana abiotičkim i biotičkim čimbenicima (Epstein, 1971.). Ioni Si ne dodaju se u hranjivi medij, ali se prilikom analize hranjivog medija uočava prisutnost Si u vrlo niskim koncentracijama (George i sur., 2008.). Ovi navodi potvrđeni su i u našem istraživanju prilikom analize

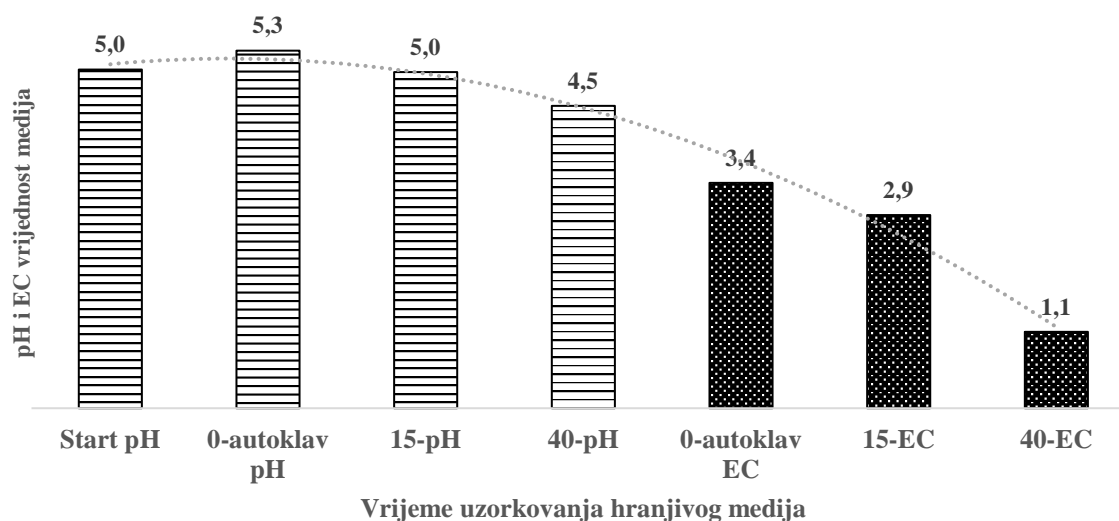
nultog tretmana (0) s ultračistom vodom. Posljedica višeg sadržaja Si u biljnom materijalu kod tretmana BI (30 mg/L), BII (75 mg/L) i EII (30 mg/L) rezultat je izloženosti biljnog materijala dodanom nano-SiO₂. Rezultati su u suglasnosti s istraživanjima koje su proveli **Gao i sur., (2006.)** koja su pokazala da primjena Si u obliku H₄SiO₄ također značajno utječe na povećanje koncentracije Si u izdancima i korijenu (biomasi) kukuruza. Isti autori navode da je akumulacija Si u staničnim stijenkama epiderme lista uglavnom bila u obliku polimeriziranog SiO₂. **Morikawa i Saigusa (2004.)** su utvrdili da se pri dodatku SiO₂ kod borovnice (kultivar Bluecrop) Si akumulira u listovima stvarajući fitolite u gornjoj epidermi te u dijelovima palisadnog parenhima, kao i u epidermi naličja lista oko puči i u stanicama zapornicama, pojedinim dijelovima spužvastog parenhima i provodnog tkiva (žile).

Bor (B) se značajno manje ugradio u tkivo biljka tretiranih s 30 mg/L nano-SiO₃ (BI), 1 i 10 mg/L nano-ZnO (CI i CII) i 80 mg/L floroglucinola (DII) u odnosu na biljke u kontrolnom tretmanu. B je vrlo važan za integritet i funkcionalnost staničnih membrana (**Lewis, 1980; Blevins i Lukaszewski, 1998.**), biosintezu lignina i održavanje meristemske aktivnosti (**Mengel i Kirkby, 1982.**). U tlu se javlja u obliku borne kiseline, a jednako se koristi i u kulturi tkiva. Prema **Oertli i Grgurevic (1974.)** te **Devlin (1975.)**, usvajanje borne kiseline najintenzivnije je pri nižem pH. Pretpostavljamo kako je razlika u akumulaciji B u tkivu biljaka upravo posljedica stabilnih niskih vrijednosti pH koje su se u našem istraživanju kretale od 4,5 do 5,0.

Jedan od izazova u tehnologiji korištenja tekućeg medija je i stabilnost pH hranjivog medija što je i dodatno potencirano odabranom kulturom i/ili kultivarom (**Bošnjak i sur., 2021.**). pH medija je prije autoklaviranja bio podešen na vrijednost 5,0 te se nakon autoklaviranja povećao do 5,3. Nakon 15 dana kulture došlo je do smanjenja pH vrijednosti kod svih tretmana na prosječnih i optimalnih pH 5,0, a nakon 15 dana kulture zabilježeno je smanjenje vrijednosti za prosječnih 0,5, odnosno do pH 4,5. (Grafikon 23.).

Nano-SiO₂ utječe i na dinamiku pH vrijednosti hranjivog medija jer nanočestice mogu povisiti pH te uslijed toga blokirati usvajanje drugih esencijalnih elemenata (**Slomberg i Schoenfisch, 2012.; Taiz i Zeiger, 2010.**). U našem istraživanju nije došlo do značajnog povećanja pH vrijednosti hranjivog medija tijekom kultivacijskog perioda kod tretmana koji su imali povećanu koncentraciju čestica nano-SiO₂ (BI, BII, EI i EII). Pretpostavka je da osim navedene redukcije pojedinih komponenti hranjivog medija (NO₃ i NH₄) te uslijed imerzije, aeracije i/ili potapanja biljnog materijala dolazi i do otpuštanja

eksudata fenolnih spojeva, etilena i sl. iz eksplantata, posebice u prvim danima kulture, koji utječu na smanjenje početne pH vrijednosti medija. Biljni materijal za svoj rast usvaja pojedine mineralne komponente medija te utječe na smanjenje vrijednosti EC i pH (**Leifert i sur., 1995.**).



Grafikon 23. Kretanje prosječnih pH i EC vrijednosti tekućeg hranjivog medija na razini cijelog pokusa

Električni konduktivitet ili vodljivost (EC) predstavlja indeks koncentracije soli i pokazatelj je koncentracije elektrolita u otopini. EC hranjive otopine povezan je s količinom dostupnih iona biljkama u zoni dodira (**Nemali i van Iersel, 2004.**). Optimalni EC specifičan je za svaku biljnu vrstu, a ovisi i o okolišnim uvjetima (**Sonneveld i Voogt, 2009.; Le Bot i sur., 1998.**). Općenito, veći EC otežava unos hranjivih tvari povećanjem osmotskog tlaka hranjive otopine, povećava gubitak hraniva i lučenje hranjivih tvari u okoliš što u konačnici rezultira onečišćenjem okoliša. Niži EC može ozbiljno utjecati na zdravlje biljaka i prinos (**Signore i sur., 2016.; Samarakoon i sur., 2006.**). Smanjenje pH vrijednosti medija u TIS sustavu utvrdili su **Chakrabarty i sur. (2007.)**, **Pearsson (2012.)** te **Bošnjak i sur. (2021)**. Daljnja degradacija pH ne bih bila povoljna za biljni materijal, jer ujedno dovodi do zamucenja i razvoja neugodnog mirisa medija uslijed razvoja određenih endogenih patogena u takvim uvjetima. Istu problematiku razvoja endogenih patogena (kontaminacije) u SETISTM sustavu utvrdili su **Lofti i sur. (2020.)**, a moguće ju je spriječiti dodavanjem biocida PPMTM u hranjivi medij koji je također bio korišten i u našem istraživanju. Jedno od potencijalnih rješenja u cilju sprječavanja smanjenja pH vrijednosti tekućeg medija je i

naknadna korekcija pH tijekom ciklusa ili kompletna zamjena svježim medijem, no taj postupak uvelike povećava cijenu same proizvodnje (**Bošnjak i sur., 2021.**).

4.4. Fiziološko-biokemijski odgovor biljaka borovnice u TIB/TIS sustavu

Sadržaj klorofila u listovima ključni je indikator fotosintetske aktivnosti dok karotenoidi imaju važnu ulogu u obrani od oksidacijskog stresa (**Shah i sur., 2017.**). Karotenoidi „hvatanjem“ ROS-a štite pojedine stanične komponente (klorofil, proteini, DNA i lipidi) od oksidativnog oštećenja (**Raposo i sur., 2015.**).

Tretmani koji su uključivali primjenu nano-SiO₂ (30 mg/L BI i 75 mg/L BII) nisu značajno utjecali na povećanje sadržaja fotosintetskih pigmenata u usporedbi s kontrolnim tretmanom. Suprotno tome, **Mahmoud i sur. (2020.)** su utvrdili da primjena nano-SiO₂ na biljkama banane (*Musa acuminata* ‘Grand Nain’) u stresnim uvjetima (solni stres i suša) povećava sadržaj klorofila u odnosu na kontrolni tretman kod svih primijenjenih koncentracija (200, 400 i 600 mg/L) pri čemu je najniža koncentracija Si (200 mg/L) bila dovoljna da održi sadržaj klorofila na razini kontrolnog tretmana. **Emamverdian i sur. (2020.)** su u istraživanju na biljkama bambusa (*Pleioblastus pygmaeus*) utvrdili pozitivne učinke nano-SiO₂ (100 do 500 μM/L) na povećanje koncentracije fotosintetskih pigmenata (klorofil a i b, ukupni klorofil i karotenoidi) koji su bili u pozitivnoj korelaciji s porastom koncentracije nanočestica. To je u skladu s našim rezultatima, gdje je tretman višom koncentracijom nano-SiO₂ (75 mg/L - BII) utjecao na povećanje sadržaja fotosintetskih pigmenata u odnosu na nižu koncentraciju od 35 mg/L (BI) koja je bila u razini kontrolnog tretmana. Tretmani kombinacijom nano-SiO₂ i floroglucinola u obje varijante (EI i EII) također nisu rezultirali povećanjem koncentracije fotosintetskih pigmenata u odnosu na kontrolni tretman te je čak uočen i negativni utjecaj više koncentracije nano-SiO₂ i floroglucinola (EII; 75 mg/L + 40 mg/L) na sadržaj klorofila a i b te karotenoida. Pojedini autori navode i negativne učinke Si na sadržaj fotosintetskih pigmenata i karotenoida. **Karimi i Mohsenzadeh (2016.)** utvrdili su značajno smanjenje sadržaja klorofila a, b i karotenoida u usporedbi s kontrolom kod pšenice (*Triticum aestivum* L.) uzgajane na tekućem Hoaglandovom mediju s dodatkom nano-SiO₂ u koncentraciji od 50 i 100 mg/L. Slične negativne učinke Si pokazali su **Sabaghnia i Janmohammadi (2015.)** na leći (*Lens culinaris* Medik), te **Rad i sur. (2014.)** na kukuruzu (*Zea mays* L.).

U našem istraživanju, tretman nižom koncentracijom nano-ZnO (1 mg/L; CI) rezultirao je nešto većim sadržajem fotosintetskih pigmenata i karotenoida u odnosu na tretman višom koncentracijom nano-ZnO (10 mg/L; CII), no oba su tretmana imala niže vrijednosti u odnosu na kontrolu. Također i u kombinaciji nano-ZnO s floroglucinolom kod tretmana FI i FII nije došlo do povećanja sadržaja fotosintetskih pigmenata i karotenoida s povećanjem koncentracije nano-ZnO (FII) te je tretman FII čak rezultirao najmanjim sadržajem fotosintetskih pigmenata i karotenoida u istraživanju. Slične rezultate utvrdili su **Faizan i sur. (2018.)** na biljkama rajčice (*Lycopersicon esculentum* L. cv. PKM-1) te **Chutipaijit i sur. (2018.)** na biljkama riže (*Oryza sativa* L.) gdje se povećanje koncentracije nanočestica Zn (16, 300 i 1000 mg/L) negativno odrazilo na sadržaj fotosintetskih pigmenata. U istraživanju na pšenici (*Triticum aestivum* L.), **Lalarukh i sur. (2022.)** su utvrdili da nano-ZnO u koncentracijama 20, 50 i 80 mg/L izaziva smanjenje sadržaja klorofila a, klorofila b, ukupnog klorofila i karotenoida u odnosu na kontrolni tretman. Navedena istraživanja u suglasnosti su s našim rezultatima. **El-Mahdy i Elazab (2020.)** su pokazali da učinak nano-ZnO na sadržaj fotosintetskih pigmenata u kulturi nara (*Punica granatum* L.) ovisi o primijenjenoj koncentraciji. Isti autori utvrdili su pozitivan učinak nano-ZnO (1 mg/L) na sadržaj fotosintetskih pigmenata (klorofil a, klorofil b i klorofil a + b) te karotenoida, ali i negativni učinak više koncentracije nano-ZnO (10 mg/L). Rezultati našeg istraživanja djelomično podupiru navode ovih autora, međutim vrijednosti sadržaja pigmenata kod primjene 1 mg/L nano-ZnO (CI) bile su slične kontrolnom tretmanu.

Manokari i sur. (2021.) u istraživanju na biljci kokolobi (*Coccoloba uvifera* L., 0,5 do 2,0 mM/L), **Gómez-Kosky i sur. (2021.)** na izdancima šećerne trske (*Saccharum* spp. cv C90-469, 10 do 20 mg/L) te **Pérez i sur. (2016.)** kod biljaka papaje (*Carica papaya* L., 79 do 158 μ M/L) iznose pozitivne učinke floroglucinola na povećanje sadržaja klorofila a i b. Rezultati dobiveni našim istraživanjem nisu u suglasnosti s rezultatima navedenih autora. Niža koncentracija floroglucinola (40 mg/L; DI) nije uzrokovala značajnu promjenu sadržaja ukupnih fotosintetskih pigmenata u odnosu na kontrolu (Tablica 25.). Suprotno tome, floroglucinol je pri višoj koncentraciji od 80 mg/L (DII) i u svim kombinacijama s nanočesticama (tretmani EI, EII, FI i FII) rezultirao značajno nižim sadržajem klorofila a i b te karotenoida u odnosu na kontrolni tretman. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da visoka koncentracija floroglucinola (DII – 80 mg/L) u tekućem hranjivom mediju negativno utječe na sadržaj pigmenta.

Na osnovi rezultata našeg istraživanja možemo zaključiti da primijenjene koncentracije nano-SiO₂ na biljkama borovnice u kontroliranim uzgojnim uvjetima (stabilna temperatura i režim svjetla) s prekomjernim režimom vlaženja nisu ugrozile fotosintetsku aktivnost. Primjetan je pozitivan trend u povećanju sadržaja fotosintetskih pigmenata i karotenoida što ukazuje na mogućnost ispitivanja viših koncentracija nano-SiO₂ u budućim istraživanjima. Kombinacija nano-SiO₂ s floroglucinolom prema prikazanim rezultatima upućuje na negativni sinergistički učinak, odnosno ne rezultira povećanjem sadržaja fotosintetskih pigmenata i karotenoida. Pojedinačni tretmani nano-ZnO u navedenim kontroliranim uvjetima, odnosno u uvjetima eksponencijalnog rasta biljaka borovnice u komorama za rast ispoljili su negativan učinak na sadržaj fotosintetskih pigmenata i karotenoida. Rezultati upućuju na mogući antagonistički odnos Zn s ostalim elementima uključenim u sintezu pigmenata. Floroglucinol u kombinaciji s nano-ZnO također pokazuje negativan sinergistički učinak na sadržaj pigmenata što je posebno izraženo kod kombinacije tretmana s višom koncentracijom nano-ZnO i floroglucinola. Iz svega navedenog možemo zaključiti da niža koncentracija nano-ZnO (1 mg/L) pojedinačno i/ili u kombinaciji s floroglucinolom u našim uvjetima predstavlja gornju granicu moguće primjene i u budućim istraživanjima. Primjena floroglucinola pojedinačno obzirom na primijenjene koncentracije pokazuje suprotne učinke. Naime, niža koncentracija floroglucinola rezultirala je sadržajem fotosintetskih pigmenata i karotenoida u razini kontrole, što je rezultiralo i nižim, povoljnim indeksom vitrifikacije (20 %, Grafikon 1.). U slučaju više koncentracije floroglucinola utvrđen je negativni učinak na sadržaj fotosintetskih pigmenata što je praćeno pojavom izražene vitrifikacije (40 %, Grafikon 1.).

Fenolne komponente kao sekundarni metaboliti, imaju važnu ulogu u rastu i razvoju biljaka (**Pagare i sur., 2015.**). Fenolni spojevi čine širok raspon tvari koje posjeduju aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina (**Harborne, 1973.**). Fenoli su vrlo važne biljne komponente koje putem svojih hidroksilnih skupina suzbijaju slobodne radikale. Fenolne komponente predaju atome vodika iz hidroksilnih skupina na slobodne radikale te tako tvore stabilne fenoksilne radikale (**Kousalya i Bai, 2016.**).

U okviru ovog istraživanja, koncentracija fenola u odnosu na kontrolni tretman bila je značajno viša kod tretmana nižom koncentracijom nano-ZnO (1 mg/L – CI), dok je najniža koncentracija fenola zabilježena kod tretmana FI, kombinacije niže koncentracije nano-ZnO (1 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L). Iz navedenog uočavamo mogući sinergistički učinak

floroglucinola s nano-ZnO na smanjenje sadržaja fenolnih komponenti. **Zaeem i sur. (2020.)** su u svom istraživanju na kalusu lana (*Linum usitatissimum* L.) pokazali da se povećanjem koncentracija nano-ZnO (5 do 50 mg/L) povećava i sadržaj fenolnih komponenti. Naši rezultati pokazali su suprotan učinak, odnosno smanjenje sadržaja ukupnih fenola povećanjem koncentracije nano-ZnO kod pojedinačnih tretmana (CI i CII), dok je povećanje njihovog sadržaja utvrđeno kod kombinacije nano-ZnO i floroglucinola (FI i FII). **Zahir i sur. (2019.)** povezuju povećanje koncentracije fenola kod biljaka lana (*Linum usitatissimum* L.) s aktivacijom obrambenog mehanizma uslijed pojave oksidacijskog stresa izazvanog nanočesticama Zn. Prema **Haichar i sur. (2016.)** fenoli se mogu sintetizirati tijekom normalnog rasta i razvoja ili akumulirati u tkivu biljke kao odgovor na različite abiotičke (visoke temperature, suša, fitotoksičnost) i biotičke stresne uvjete (korisni i antagonistički mikroorganizmi). Ako koncentracija Zn prelazi granicu tolerancije, on se akumulira u tkivu i uzrokuje fitotoksičnost što rezultira visokom produkcijom ROS-a (**Prasad i sur., 1999.**) i ograničavanjem rasta (**Longnecker i sur., 1993.**), što u našem slučaju nije potvrđeno. Kod tretmana višom koncentracijom nano-ZnO od 10 mg/L pojedinačno (CII) ili u kombinaciji s floroglucinolom (FII), sadržaj fenola bio je niži ili u razini kontrolnog tretmana.

U biljkama tretiranim s nano-SiO₂ (BI i BII) kao i kombinacijom s floroglucinolom u obje varijante (EI i EII) sadržaj fenola kretao se u razini kontrolnog tretmana bez značajne razlike (Tablica 24.). **Mahmoud i sur. (2020.)** su na biljkama banane utvrdili pozitivnu korelaciju smanjenja fenola s porastom koncentracije nano-SiO₂ (200 do 600 mg/L). **El-Kady i sur. (2017.)** su također na biljkama banane (*Musa sp.* var. Grand Nain) ustanovili povećanje koncentracije fenola, ali samo pri nižoj koncentraciji nano-SiO₂ (50 mg/L) u odnosu na tretmane sa 100 i 150 mg/L koji su rezultirali značajno nižim sadržajem fenola u odnosu na kontrolu. **Phan i Letouze (1982.)** su utvrdili veću zastupljenost fenolnih spojeva u biljkama trešnje (*Prunus avium* L.) koje su pokazale manji stupanj vitrifikacije (normalne biljke) u odnosu na hiperhidrirane biljke. Proizvodnja fenola izravno je povezana s omjerom C/N, a budući da fenoli utječu na lignifikaciju, dodatak floroglucinola u hranjivi medij pomaže biljkama da prevladaju vitrifikaciju (obrnuti proces), odnosno vrate se u normalno stanje (**Al-Maarri i Al-Ghamdi, 2000.**).

Floroglucinol predstavlja fenolni spoj poznat po svojim učincima na stimulaciju rasta biljaka, a njegov učinak često je prikriven drugim sličnim spojevima (**Teixeira da Silva i sur., 2013.**). **Ibrahim i sur. (2020.)** u istraživanju na korijenu dracene (*Dracaena marginata* Lam.) iznosi da je floroglucinol (300 mg/L) sam i/ili u kombinaciji s IBA (indol-3-maslačna

kiselina) smanjio sadržaj fenola u odnosu na kontrolni tretman. U skladu s našim rezultatima, **Rengasamy i sur. (2015.)** nisu utvrdili znatno povećanje sadržaja ukupnih fenola u izdancima i korijenu kukuruza (*Zea mays* cv. Border King) u odnosu na kontrolni tretman. U našem je istraživanju tretman s nižom koncentracijom floroglucinola (40 mg/L; DI) rezultirao podjednakim sadržajem ukupnih fenola kao i kod kontrolnog tretmana. Međutim, tretman višom koncentracijom floroglucinola (80 mg/L; DII) utjecao je na značajno smanjenje sadržaja fenola u odnosu na kontrolu. Floroglucinol u kombinaciji s višim koncentracijama nanočestica Si i Zn (EII i FII) bio je u razini kontrolnog tretmana, dok je u kombinaciji nižim koncentracijama nanočestica Si i Zn na tretmanima EI i FI rezultirao značajno nižim sadržajem ukupnih fenola. Navedeni rezultati upućuju na smanjenje sadržaja ukupnih fenola u kombinaciji floroglucinola (40 mg/L) i nižih koncentracija nano-SiO₂ od 30 mg/L te nano-ZnO od 1 mg/L.

Nekontrolirana proizvodnja ROS-a nastaje kada njihova razina premaši antioksidacijsku obrambenu sposobnost biljke te posljedično može rezultirati poremećajem metabolizma kroz inaktivaciju enzima, nestabilnosti genoma i mutacije DNA koje utječu na razne fiziološke funkcije te u konačnici na vitalnost stanica (**Štolfa i sur., 2015.; Dutta i sur., 2018.**). Stoga su biljke razvile niz enzimskih i neenzimskih antioksidacijskih mehanizama koji zajedno čine ukupni antioksidacijski kapacitet/aktivnost (UAA) stanica (**Larson, 1988.; Ghiselli i sur., 2000.**). UAA se temelji na djelovanju hidrofilnih i lipofilnih spojeva. Hidrofilni spojevi su uglavnom fenolni spojevi i vitamin C koji čine 83% UAA, dok lipofilne spojeve predstavljaju karotenoidi, vitamin E i lipofilni fenoli koji čine 17% UAA (**Kotíková i sur., 2011.**). Najviše vrijednosti UAA u našem istraživanju utvrđene su kod tretmana CI s nižom koncentracijom nano-ZnO (1 mg/L) dok je najniža vrijednost izmjerena kod tretmana FI s nižom koncentracijom nano-ZnO (1 mg/L) u kombinaciji s floroglucinolom (40 mg/L). **Zafar i sur. (2016.)** utvrdili su povećanje UAA u korijenu i stabljici crne gorušice (*Brassica nigra* L.) uslijed primjene visokih koncentracija nano-ZnO (500 do 1500 mg/L). Suprotno tome, u našem su istraživanju oba tretmana s nano-ZnO (1 mg/L – CI i 10 mg/L - CII) rezultirala smanjenjem UAA u odnosu na kontrolu. **Javed i sur. (2018.)** su kod biljke stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni) utvrdili linearno povećanje UAA koje je pratilo koncentraciju nano-ZnO (50 do 100 mg/L). Istražujući istu biljnu vrstu, **Ahmad i sur. (2020.)** su dobili suprotne rezultate te je najveći sadržaj UAA zabilježen pri tretmanu s nižom koncentracijom nano-ZnO (2 mg/L) što je u skladu s našim rezultatima kod tretmana CI (1 mg/L nano-ZnO). Kod tih su biljaka utvrđene najviše vrijednosti UAA u

istraživanju, a bile su značajno veće od kontrole i tretmana s višom koncentracijom (10 mg/L nano-ZnO; CII).

Primjena Si u obliku K_2SiO_3 (250 i 500 mg/L) u odnosu na nano- SiO_2 (250 i 500 mg/L) povećala je UAA kod biljaka rajčice (var. El Cid, **Pinedo-Guerrero i sur., 2020.**). Isti autori navode da su tretmani s nano- SiO_2 bili u razini kontrolnog tretmana što je u suglasnosti s našim rezultatima za tretmane s nano- SiO_2 (BI i BII), ali i obje kombinacije nano- SiO_2 s floroglucinolom (EI i EII). U našem se istraživanju sadržaj UAA nakon pojedinačnih tretmana floroglucinolom (DI i DII), ali i kombinaciji tretmana s nanočesticama (EI, EII i FII) nije značajno razlikovao u odnosu na kontrolu. Značajno manji sadržaj UAA u odnosu na kontrolni tretman zabilježen je kod tretmana FI, odnosno kombinacije nano-ZnO u nižoj koncentraciji (1 mg/L) i floroglucinola (40 mg/L).

Jaka korelacija između UAA i sadržaja ukupnih fenola u našem istraživanju u suglasnosti je s rezultatima istraživanja mikropropagacije pasiflore (*Passiflora* spp., **Bendini i sur., 2006.**), luka vlasca (*Allium schoenoprasum*, **Štajner i sur., 2011.**), orhideje (*Dendrobium thyrsiflorum*, **Bhattacharyya i sur., 2015.**) te krumpira (*Solanum tuberosum* L., **Kim i sur., 2019.**). **Sayd i sur. (2010.)** su u svom istraživanju pri mikropropagaciji gardenije (*Gardenia jasminoides* Ellis) utvrdili pozitivnu korelaciju između UAA i koncentracije ukupnih fenola. Navode kako postojanje ove jake veze ukazuje da sadržaj fenolnih komponenti u biljkama izravno pridonosi koncentraciji UAA, biosintezi fenilpropanoida i flavonoida. **Cheniany i sur. (2013.)** u svom istraživanju na mikropropagaciji oraha (*Juglans regia* L.) pozitivnom korelacijom između sadržaja ukupnih fenola i UAA opisuju razlike između genotipova. Stoga, pozitivna korelacija između ove dvije vrijednosti upućuje na snažni odgovor biljaka kroz proizvodnju fenolnih spojeva te posljedično povećanje ukupne antioksidativne aktivnosti s ciljem obrane od štetnih posljedica ROS-a.

Osim fenola, važnu ulogu u antioksidacijskom odgovoru biljke ima i askorbinska kiselina kao važan neenzimski antioksidans i komponenta askorbat-glutationskog ciklusa (**Hasanuzzaman i sur., 2019.**). Askorbinska kiselina ima velik utjecaj na sve stanične procese, od temeljnih procesa poput stanične diobe do zaštite od stresnih čimbenika (**Conklin i sur., 2000.**). Povećan sadržaj askorbinske kiseline u biljnom tkivu ublažava oštećenja koja mogu nastati uslijed razvoja ROS-a (**Hsu i Kao, 2007.**).

Ma i sur. (2016.) su utvrdili povećanje sadržaja askorbinske kiseline kod biljaka pšenice (*Triticum aestivum* L. cv. Yumai 49–198) nakon tretmana sa Si (Na_2SiO_2) u uvjetima suše. U listu i korijenu soje (*Glycine max* L. cv. M7) tretmani nanočesticama SiO_2 (0,5 i 1 mM/L) također povećavaju sadržaj askorbinske kiseline (**Farhangi-Abriz i Torabian, 2018.**). Slične rezultate utvrdili su **Liu i sur. (2009.)** na biljkama krastavca (*Cucumis sativus* cv. Jinchun 4) te **Habibi (2016.)** na biljkama kukuruza (*Zea mays* L. cv. Fajr) koje su bile izložene suši i niskim temperaturama. Na temelju iznesenih rezultata istraživanja vidljivo je da primjena Si u stresnim uvjetima može utjecati na poboljšanje obrambenog antioksidacijskog sustava koje se očituje u povećanju koncentracije askorbinske kiseline kao odgovora na ublažavanje stresa. Suprotno gore navedenim navodima, u našem istraživanju nije došlo do promjene sadržaja askorbinske kiseline u odnosu na kontrolu kod tretmana s nano- SiO_2 (BI, BII, EI i EII) te je i sadržaj fotosintetskih pigmenata i ukupnih fenola ostao na razini kontrolnih vrijednosti (Tablica 24. i 25.).

U istraživanju folijarne primijene nano-ZnO u koncentracijama od 25, 50, 100 i 200 mg/L na biljkama patlidžana (*Solanum melongena* L. cv. Soma F1), **Howladar (2019.)** je utvrdio povećanje sadržaja askorbinske kiseline kao rezultat aktivacije antioksidativnog obrambenog sustava biljaka i povećanja kapaciteta uklanjanja ROS-a. **Sofy i sur. (2020.)** su na biljkama graška (*Pisum sativum* L. cv. Master B) ispitivali učinkovitost primjene Zn u obliku ZnSO_4 pojedinačno (100 mg/L) i u kombinaciji s biljnim regulatorom paklobutrazolom (PBZ 200 mg/L) u uvjetima solnog stresa. Oba tretmana izazvala su akumulaciju askorbinske kiseline. Povećana razina askorbinske kiseline pri ovim tretmanima utjecala je na stimulativni učinak askorbat-glutationskog ciklusa. Povećanje sadržaja askorbinske kiseline u biljnom tkivu imperativ je u kontroli staničnog redoks sustava antioksidativne zaštite (**Sofy i sur., 2020.**). Značajno povećanje sadržaja askorbinske kiseline u odnosu na kontrolni tretman, ali i sve ostale tretmane u našem istraživanju utvrđeno je samo kod tretmana kombinacije više koncentracije nano-ZnO (10 mg/L) i floroglucinola (FII; Tablica 24.). Oba pojedinačna tretmana s floroglucinolom (DI i DII) nisu se značajno razlikovala u odnosu na kontrolu, a nešto je niži sadržaj askorbinske kiseline izmjeren na tretmanu s višom koncentracijom floroglucinola (80 mg/L; DII). Pojedinačni tretman s nano-ZnO u nižoj koncentraciji (CI; 1 mg/L), ali i u kombinaciji s floroglucinolom (FI) rezultirao je sadržajem askorbinske kiseline u rangu s kontrolnim tretmanom. Jedino je pojedinačni tretman s višom koncentracijom nano-ZnO od 10 mg/L (CII) rezultirao značajno nižim sadržajem askorbinske kiseline u odnosu na kontrolni tretman. Slične rezultate utvrdili

su **Lalarukh i sur. (2022.)** kod biljaka pšenice (*Triticum aestivum* L.) u uvjetima solnog stresa, gdje je smanjenje koncentracije askorbinske kiseline bilo korelirano s povećanjem koncentracije nano-ZnO (20, 50 i 80 mg/L).

Lipidna peroksidacija (LPO) glavni je molekularni mehanizam uključen u oksidativno oštećenje staničnih struktura, a nastaje uslijed nakupljanja ROS-a kao posljedice izloženosti biljaka stresnim uvjetima (**Dianzani i Barrera, 2008.**). ROS produkti, posebice H₂O₂ smanjuju fluidnost membrane, olakšavaju izmjenu fosfolipida na lipidnom dvosloju stanične membrane i olakšavaju istjecanje elektrolita (**Fam i Morrow, 2003.**). Intenzitet LPO često se procjenjuje kroz koncentraciju krajnjeg produkta malondialdehida (MDA) kao nusproizvoda oksidacije lipida ROS spojevima (**Gill i Tuteja, 2010.; Gaschler i Stockwell, 2017.**). **Liang i sur. (2007.)** su utvrdili da ioni Si pomažu u stabilizaciji strukture proteina te rezultiraju taloženjem Si oko stanične stijenke i pospješuju njenu lignifikaciju. Isti autori zaključuju kako primjena Si dovodi do njegovog taloženja u stanične membrane koje postaju čvršće te se posljedično smanjuje istjecanje elektrolita. Prema ovim autorima Si je nepokretan i inertan element u biljkama, koji se nakon taloženja u stanicama pretvara u silikagel kojemu je uloga čvrstoća i stabilnost stanica. **Siddiqui i sur. (2014.)** su u istraživanju na biljkama bundeve (*Cucurbita pepo* L.) izloženim solnom stresu utvrdili povišen sadržaj MDA koji je ukazivao na povećanu razinu peroksidacije lipida, dok su oksidativna oštećenja i promjene u membrani rezultirale istjecanjem elektrolita. Međutim, na svim tretmanima koji su uključivali primjenu nano-SiO₂ (1,5 do 7,5 g/L) zabilježena je značajna supresija peroksidacije lipida, odnosno niži sadržaj MDA i koncentracije elektrolita. Slične rezultate iznose **Abdel-Hallem i sur. (2017.)** na biljkama riže (*Oryza sativa* L. cv. Skha 1) nakon primjene 150 g/L nano-SiO₂ te **Li i sur. (2012.)** na vrsti *Indocalamus barbatus* kod svih tretmanima s nano-SiO₂ (150 – 450 mg/L). **Karimi i Mohsenzadeh (2016.)** su na biljkama pšenice (*Triticum aestivum* L. var. Chamran) utvrdili da je intenzitet LPO pri koncentraciji nano-SiO₂ od 50 i 100 mg/L bio gotovo jednak kontrolnom tretmanu, dok je pri tretmanima s 200, 400 i 800 mg/L nano-SiO₂ došlo do značajnog porasta intenziteta LPO u odnosu na kontrolu. To ukazuje kako visoke koncentracije nano-SiO₂ mogu pospješiti stvaranje slobodnih radikala i narušiti integritet membrana te uzrokovati povećanje intenziteta LPO, što potvrđuju i istraživanja na kukuruzu (*Zea mays* L.; **Rad i sur., 2014.**). **Gunes i sur. (2007.)** iznose kako Si u obliku Na₂Si₃O₇ učinkovito smanjuje stopu LPO u uvjetima toksične koncentracije bora u biljkama špinata

(*Spinacia oleracea* L.). Primjena drugih oblika Si kod pojedinih biljnih vrsta u uvjetima solnog stresa ublažila je peroksidaciju lipida te je došlo do smanjenja propusnosti plazmaleme za elektrolite (ječam, *Hordeum vulgare* L. – H₄SiO₄ **Liang i sur., 2003.**; kukuruz, *Zea mays* L. – Na₂SiO₃ **Moussa, 2006.**; podloge vinove loze, *Vitis vinifera* L. – Na₂Si₃O₇ **Soylemezoglu i sur., 2009.**; krastavac, *Cucumis sativus* L. i južnokorejska endemična biljka, *Cotoneaster wilsonii* Nakai – K₂SiO₃ **Zhu i sur., 2004.** te **Sivanesan i sur., 2011.**). U našem istraživanju primjena obje koncentracije nano-SiO₂ (BI i BII) nije značajno utjecala na intenzitet LPO te se vrijednosti nisu razlikovale u odnosu na kontrolu (Tablica 24.) što je u suglasnosti s rezultatima koje su **Karimi i Mohsenzadeh (2016.)** utvrdili na biljkama pšenice (*Triticum aestivum* L. var. Chamran).

Folijarna primjena nano-ZnO u koncentraciji od 1,5 mg/L smanjila je razinu MDA u biljkama slanutka (*Cicer arietinum* L. var. HC-1, **Burman i sur., 2013.**). Suprotno tome, u našem je istraživanju niža koncentracija nano-ZnO u tretmanu CI (1 mg/L) te u kombinaciji s floroglucinolom (FI) rezultirala značajno većim sadržajem produkata LPO u odnosu na kontrolu te tretman višom koncentracijom nano-ZnO (10 mg/L) pojedinačno (CII) ili u kombinaciji s floroglucinolom (FII). Sumarno gledajući, oba tretmana nano-ZnO (CI i FI) rezultirala su značajno većim sadržajem produkata LPO u odnosu na ostale tretmane i kontrolu. Tretmani s višom koncentracijom nano-ZnO (CII) pojedinačno i u kombinaciji s floroglucinolom (FII) prema sadržaju produkata LPO bili su u rangu s kontrolnom varijantom. Suprotne, negativne učinke nano-ZnO pri koncentracijama višim od 400 ppm na biljkama soje (*Glycine max* L.) iznose **Hashemi i sur., (2019.)**. Autori navode značajno povećanje sadržaja MDA pri koncentraciji nano-ZnO od 400 ppm u odnosu na kontrolni tretman i koncentraciju od 200 ppm. U našem se istraživanju kod pojedinačnih tretmana floroglucinolom (DI i DII) razina LPO nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolu.

4.5. Evaluacija primijene nanočestica SiO₂, ZnO i biljnog regulatora floroglucinola u evoluciji protokola za mikropropagaciju borovnice na tekućem hranjivom mediju (TIB/TIS sustav)

Mikropropagacija biljnog tkiva *in vitro* se u današnje vrijeme još uvijek zasniva na izolaciji čiste kulture i multiplikaciji na agaru (polučvrstom mediju) te komorama za rast (staklenke, pvc posude sa ili bez filtera) malog volumena. Takav pristup u kombinaciji sa

standardiziranim bazičnim protokolima osigurava kvalitetu proizvoda i kontrolu kultivacijskog perioda (ljudski faktor) te posljedično smanjenje fitosanitarnog rizika.

Unatoč tome, suvremeni koncept mikropropagacije biljnog tkiva u kontekstu masovne reprodukcije i automatizacije procesa prepoznaje korištenje tekućeg medija i bioreaktore kao validnu tehnologiju. Kako smo ranije naveli, proklamirane prednosti i stoga daljnji razvoj tehnologije podrazumijeva povećanje autonomnosti automatiziranih sustava pri manipulaciji i samoj kontroli pojedinog ciklusa, s jasno definiranim ciljem povećanja produktivnosti, efikasnosti i amortizacije. „Software i hardware“ takovih sustava omogućava postizanje gotovo idealnih fotomiksotrofnih uvjeta potrebnih za metabolizam, odnosno rast i razvoj samog biljnog materijala već prema namjeni (fenofaza i razvojni stadij eksplantata) ili kultiviranoj vrsti (varijetetu).

Ovakav načini mikropropagacije borovnice je novina u proizvodnji. Zbog lakše kontrole uvjeta, primjena bioreaktora u proizvodnji omogućuje poboljšanja u fiziološkim procesima biljke kao npr. fotosinteze u uvjetima *in vitro*. U odnosu na konvencionalni sustav mikropropagacije, biljni materijal proizveden u bioreaktorima pokazuje jači stupanj rasta i adaptabilnosti na vanjske uvjete pri prebacivanju u *ex vitro* uvjete (Arencibia i sur., 2013.). Međutim optimizacijom broja imerzija (vlaženja, potapanja – mokra faza), broja aeracija (izmjena plinova – pražnjenje CO₂), redukcijom osvjetljenja (vremena, intenziteta, spektra) i ubrzavanjem metabolizma biljke (šećeri, NH₄) drastično opada efikasnost (trajanje ciklusa, koeficijent multiplikacije) i kvaliteta biljnog materijala. Upravo, posljedično pojava vitifikacije ili hiperhidriranosti (eng. *Hyperhydricity*) biljnog tkiva u svim fazama reprodukcije (multiplikacija, ukorjenjivanje) predstavlja najveći izazov u etabliranju navedene tehnologije. Sve gore navedeno ima za posljedicu upitnu rentabilnost proizvodnog procesa i glavna je prepreka u globalnoj ekspanziji iste.

U našem istraživanju nastojali smo upravo upotrebom specifičnih nanočestica potaknuti moguće fiziološke odgovore metabolizma s ciljem kontrole ili potiskivanja opisanog stresa. Neznatan broj referenci koje upućuju na moguće pozitivne učinke kontrole vitifikacije u mikropropagaciji borovnice kod upotrebe TIB/TIS sustava bioreaktora čini ova istraživanja opravdanim. Kako bi se dobile referentne točke i dobile jasno definirane uzročno posljedične reakcije, primijenjeni tretmani uključivali su male i visoke razine koncentracije kako nano-SiO₂ (30 i 75 mg/L), nano-ZnO (1 i 10 mg/L) tako i biljnog regulatora floroglucinola (40 i 80 mg/L), pojedinačno (BI, BII, CI, CII, DI i DII) i/ili u kombinaciji (tretmani EI, EII, FI, FII). Analiza i diseminacija rezultata trebaju pokazati jasan

trend i smjer djelovanja pojedinih nanočestica u cilju daljnjeg empirijskog usavršavanja protokola.

Postavljeni kontrolni tretman (K) predstavlja sintezu najnovijih tehnoloških praksi u korištenju TIB/TIS sustava u komercijalnoj mikropropagaciji biljnog materijala. Pored prekondicioniranja kemijskog sastava hranjive otopine (podešavanje pH, mikro i makro soli, balansno podešavanje koncentracije hormona auksina i citokinina) izvršena je i kemijska stabilizacija medija dodavanjem biocidnog agensa (PPM™). Ostali aspekti podešavanja fotomiksotrofnih uvjeta uključivali su podešavanje temperature, intenziteta i periodike osvjetljenja (imitacija dan – noć). Konačno definiran je broj i trajanje uranjanja (imerzija), broj i trajanje ventilacije uz dodatno obogaćivanje atmosfere sa CO₂ između referentnih intervala.

Rezultati na kontrolnom tretmanu potvrđuju dostizanje komercijalnih standarda s aspekta produktivnosti (multiplikacija i dužina kultivacijske faze) i morfoloških parametara. Multiplikacija po izdanku prosječno je iznosila 2,65, odnosno 11,23 po ukupnom broju izdanka pogodnih za disekciju na pojedinom kalusu (najviše u istraživanju). Također fotosintetska aktivnost izražena kroz pojedinačne (klorofil a i b) i ukupne klorofile (klorofil a+b) te sadržaj karotenoida bila je najveća, ali ne značajno veća u odnosu na tretmane sa nano-SiO₂ (30 mg/L; BI i 75/mg/L; BII) i floroglucinolom (40 mg/L; DI). Vrijednosti fiziološko-biokemijskih pokazatelja relativno su bile stabilne, a produkti lipidna peroksidacije (LPO) u odnosu na ostale tretmane nisu bili izraženi.

Dodavanjem nano-SiO₂ u dvije različite koncentracije (30 i 75 mg/L; BI i BII) pokazalo je da bioakumulacija silicija u tkivu prati porast koncentracije, ali bez uočljive štetne reakcije. Indeksi vitrifikacije na tretmanima BI (nano-SiO₂ 30mg/L) i BII (nano-SiO₂ 75 mg/L) bili su niži (20%) u odnosu na kontrolni tretman. Stabilnost rasta i razvoja ogleđa se u pravilnim proporcijama morfometrijskih parametara (broj listova, broj nodija, visina i broj izdanka). Parametri produktivnosti (multiplikacija po izdanku i multiplikacija po ukupnom broju) također su u rangu kontrolnog tretmana. Sadržaj fotosintetskih pigmenata i karotenoida bio je stabilan i usporediv sa kontrolnim tretmanom i tretmanima koji su uključivali pojedinačno ili u kombinaciji nižu koncentraciju floroglucinola (40 mg/L). Biokemijski pokazatelji antioksidativne reakcije (ukupni fenoli i ukupna antioksidacijska aktivnost) također ne upućuju na pojavu štetnih procesa prilikom rasta izdanaka borovnice. Istovremeno na pojedinačnim tretmanima, ali i u kombinaciji s floroglucinolom uočljiv je trend povećanja sadržaja askorbinske kiseline porastom koncentracije silicija. Sumarno,

tretmani BI i BII (30 i 75 mg/L nano-SiO₂) nisu imali stresan učinak za biljke te nije došlo do povećanja razine LPO, a istovremeno im se nije promijenio sadržaj pigmenata, fenola i askorbinske kiseline u odnosu na kontrolni tretman. Također, biljke su imale nisku stopu vitrifikacija od 20% uz pravilne proporcije morfometrijskih parametara (broj listova, broj nodija, visina i broj izdanka). Parametri produktivnosti (multiplikacija po izdanku i multiplikacija po ukupnom broju izdanaka) bile su na razini kontrolnog tretmana što ove tretmane izdvaja kao najučinkovitije u istraživanju.

Reakcija biljaka borovnice na primijenjene koncentracije nano-ZnO (1 i 10 mg/L; CI i CII) bila je vrlo znakovita i za većinu analiziranih parametara vrlo značajna. Indeks vitrifikacije kod oba tretmana iznosio je 30 %. Nije došlo do povećanja visine izdanka, a broj iskoristivih izdanka za disekciju po izdanku bio je nizak, kao i ukupna multiplikacija po izdancima. Također sadržaj fotosintetskih pigmenata i karotenoida nije bio u razini kontrolnog tretmana. Rezultati pokazuju kako je niža koncentracija nano-ZnO (CI) potaknula vrlo izraženu antioksidativnu aktivnost (najviša koncentracija fenola, ukupna antioksidativna aktivnosti i sadržaj askorbinske kiseline) te visok stupanj lipidne peroksidacije (LPO = 62.31 nmol/g).

Floroglucinol kao suvremeni fitoregulator ispoljio je različit odgovor kod izdanaka borovnice. Svi praćeni morfometrijski i fiziološko-biokemijski parametri značajno su reagirali na razliku u primijenjenim koncentracijama. Naime, niža primijenjena koncentracija (40 mg/L; DI) pozitivno je utjecala na smanjenje vitrifikacije (20%), ali i rast i razvoj (visina, broj izdanaka i multiplikacija po izdanku) eksplantata borovnice. Sadržaj ukupnih klorofila (klorofil a i b) i karotenoida bio je izražen na što upućuju i stabilne vrijednosti antioksidativne aktivnosti bez uočenog stresa. Nasuprot tome, viša koncentracija (80 mg/L; DII) nije izazvala zadovoljavajuću reakciju rasta i razvoja borovnice. Ne možemo tvrditi da visoka koncentracija floroglucinola izaziva toksični učinak. Pretpostavljamo da je svojevrsna supresija rasta i posljedično antioksidativni odgovor uvjetovao smanjenje u sadržaju pigmenata (klorofili i karotenoidi). Ne znamo u kojoj je mjeri to posljedica vezanja vode i utjecaja na vodni potencijal tkiva u procesu lignifikacije. Sinergistički učinak floroglucinola u kombinaciji sa silicijem (EI i EII) potpuno je izostao. Nije došlo do pozitivnog učinka na većinu praćenih parametara. Gledano kroz indeks vitrifikacije izdanci borovnice bili su izraženije vitrificirani (40%). U našem istraživanju floroglucinol je pokazao drugo svojstvo, a to je izvjesni stupanj puferizacije u kombiniranim tretmanima sa silicijem i cinkom (FI). Na osnovu rezultata tretmana FI (1 mg/L nano-ZnO + 40 mg/L

floroglucinol) u pogledu malog stupnja vitrifikacije (10 %), sadržaja fotosintetskih pigmenata i karotenoida, ali i morfometrijskih parametara (visina izdanka, multiplikacija po izdanku), smatramo da se ovaj učinak može pripisati djelovanju samog floroglucinola, a manje njegovom sinergijskom učinku s cinkom.

Rezultati našeg istraživanja sugeriraju da postoji potencijal u primjeni nanočestica SiO₂ ali i biljnog regulatora floroglucinola u supresiji vitrifikacije izdanka borovnice pri uzgojnim uvjetima TIB/TIS bioreaktora na tekućem hranjivom mediju. Usavršavanje protokola ukazuje na potrebu određivanja preciznijih koncentracija silicija, ne samo u formi nano frakcije SiO₂, nego i kao ortosilicijske kiseline i drugih kemijskih oblika silicija. Na osnovu prikazanog, poželjne koncentracije nalaze se u rasponu do 30 mg/L. Utvrđenom bioakumulacijom silicija u tkivu, veličina frakcije nanočestica ne bi trebala prelaziti 20 nm, dok veličine manje od 10 nm treba dodatno ispitati. Pozitivni učinak floroglucinola također ukazuje na potrebu još preciznijeg određivanja učinkovitih koncentracija u intervalu od 0–40 mg/L.

Obzirom na različit mehanizam djelovanja, dodatna optimizacije protokola mogla bi se usmjeriti i putem „split“ (podijeljene) primjene. Uzgojna komora za rast je intaktna kroz vrijeme kultivacijskog perioda u TIB/TIS sustavu, a modularnost sustava omogućava jednostavnu zamjenu hranjivog medija. Naime, početna faza inicijacije kulture obilježena je stalnim miješanjem eksplantata uslijed imerzije i ventilacije te utječe na razdoblje potrebne aklimatizacije. To je period intenzivnog otpuštanja fenolnih komponenti, ali i etilena. Stabilizacija se postiže tek nakon nekontroliranog rasta i formiranja kalusa, uslijed nemogućnosti pravovremenog geotropnog pozicioniranja i uspostavljanja balansa polariteta auksinske aktivnosti u eksplantatima. Stoga treba ispitati mogućnost dodavanja nano-SiO₂ u početnoj fazi aklimatizacije prilikom uspostavljanja ravnoteže rasta (do 20-tog dana kultivacije) te primjenu floroglucinola u kasnijoj fazi kultivacije prilikom zamjene hranjivog medija.

5. ZAKLJUČCI

Provedena istraživanja u cilju optimizacije mikropropagacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) primjenom nanotehnologije, odnosno nanočestica SiO₂ (nano-SiO₂), ZnO (nano-ZnO) i biljnog regulatora floriglucina u imerznom (TIB/TIS) sustavu bioreaktora upućuju na sljedeće zaključke:

1. Značajne razlike u indeksu vitrifikacije, anatomskim značajkama lista, morfološkim pokazateljima rasta i razvoja, stabilnosti hranjivog medija, bioakumulaciji elemenata mineralne ishrane te fiziološko-biokemijskom odgovoru biljaka borovnice, ukazuju da su primijenjeni tretmani izazvali različite promjene i odgovore na stresne uvjete prekomjernog vlaženja biljnog materijala (vitrifikacije) u imerznom (TIB/TIS) sustavu bioreaktora.
2. Indeks vitrifikacije kretao se u rasponu od 10 do 40 %. Kontrolni tretman očekivano je rezultirao vitrifikacijom s visokom vrijednošću indeksa od 40 %. Tretmani nano-SiO₂ (30 i 75 mg/L), tretman floriglucinolom (40 mg/L), tretmani nano-ZnO (1 i 10 mg/L) i obje kombinacije tretmana nano-ZnO s floriglucinolom smanjili su vitrifikaciju biljnog materijala u odnosu na kontrolni tretman. Visoka koncentracija floriglucina (80 mg/L) te obje kombinacije tretmana s nano SiO₂ (30 i 75 mg/L) nisu značajno utjecale na promjenu indeksa vitrifikacije u odnosu na kontrolu.
3. Analiza poprečnog presjeka listova biljaka borovnice s visokim indeksom vitrifikacije (40 %) pokazala je veliko odstupanje od pravilnog rasporeda i građe staničja mezofila lista. Listove vitrificiranih biljaka karakterizira odstupanje u rasporedu i građi palisadnog i spužvastog parenhima te veliki međustanični prostori.
4. Floriglucinol primijenjen pojedinačno (40 i 80 mg/L), ali i u kombinaciji s nano-SiO₂ i nano-ZnO utjecao je na povećanje broja puči u epidermi listova borovnice u odnosu na kontrolu. Pojedinačni tretmani nano-SiO₂ (30 i 75 mg/L) značajno su reducirali broj puči u epidermi listova biljaka borovnice, ali bez negativnog utjecaja na indeks vitrifikacije (20 %). Vrijednosti dimenzija puči i otvora porusa kod svih tretmana u istraživanju bile su slične kao i kod kontrolnih biljaka.
5. Analiza morfometrijskih značajki biljaka borovnice (broj i visina izdanaka, broj listova i nodija te dužina internodija) i parametara produktivnosti (multiplikacija po izdanku i

broju izdanaka) pokazala je da nano-SiO₂ u pojedinačnim tretmanima ali i u kombinaciji s floroglucinolom nije uzrokovao promjene u vrijednostima parametara u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, tretmani nano-ZnO (1 i 10 mg/L) smanjili su vrijednosti morfometrijskih parametara te multiplikaciju biljaka. Jedino odstupanje utvrđeno je kod povećanja visine izdanaka tretiranih floroglucinolom (40 mg/L) i tretmanom kombinacije nano-ZnO (1 mg/L) s floroglucinolom (40 mg/L).

6. Smanjenje koncentracije elemenata biljne ishrane u hranjivom mediju na razini cijelog pokusa pratilo je dinamiku usvajanja elemenata u tkivu eksplantata. Na kraju kultivacijskog perioda pH hranjivog medija zadržao je standardiziranu vrijednost (pH 4,5), dok su EC vrijednosti linearno pratile smanjenje koncentracije iona soli. Na kraju kultivacijskog perioda (40 dana) biljke su utrošile hranjive elemente te je prema vrijednostima koncentracija utvrđen velik utrošak amonijskog oblika dušika (87,6 %) i molibdena (87,5 %), fosfora (80,08 %), cinka (Zn – 78 %, Zn 1 - 73,4 % i Zn 2 - 71,3 %), bakra (75 %), kalija (69,3 %), željeza (64,1 %) te nešto više od polovice magnezija (52,6 %), zatim 43,9 i 40,9 % dodanog silicija (Si 2 i Si 1) te mangana (34,1 %), sumpora (29 %), kalcija (25,6 %), natrija (21,8 %), nitratnog oblika dušika (19,1 %) i 4,1 % bora. Bioakumulacija cinka (Zn) i silicija (Si) u biljnom tkivu u odnosu na kontrolni tretman bila je u pozitivnoj korelaciji s primijenjenim vrijednostima nano-SiO₂ i nano-ZnO.
7. Primjena nano-SiO₂ (30 i 75 mg/L) kao i niže koncentracije floroglucinola (40 mg/L) na biljkama borovnice nije utjecala na promjene u sadržaju fotosintetskih pigmenta (ukupni klorofil) i karotenoidi u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, tretmani nano-ZnO (1 i 10 mg/L), floroglucinolom (80 mg/L) kao i tretmani kombinacije nano-SiO₂ i nano-ZnO s floroglucinolom izazvali su smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenta i karotenoida.
8. Primjena nano-SiO₂ (30 i 75 mg/L) nije imala stresan učinak na biljke borovnice te nisu utvrđene značajne promjene u sadržaju produkata lipidne peroksidacije, ukupnih fenola, klorofila i karotenoida, askorbinske kiseline i ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti u odnosu na kontrolni tretman. Također, kod navedenih tretmana utvrđena je niska stopa vitrifikacije te pravilne proporcije morfometrijskih parametara (broj listova, broj nodija, visina i broj izdanaka). Vrijednosti parametara produktivnosti (multiplikacija po izdanku i multiplikacija po ukupnom broju izdanaka) bile su slične kontrolnim vrijednostima što ove tretmane izdvaja kao najučinkovitije.

-
9. Floroglucinol kao biljni regulator pri nižoj koncentraciji od 40 mg/L također nije izazvao značajne promjene u sadržaju produkata lipidne peroksidacije, ukupnih fenola, klorofila i karotenoida, askorbinske kiseline i ukupne antioksidacijske aktivnosti u odnosu na kontrolu te je imao pozitivan učinak na pojedine morfometrijske parametre i produktivnost (visina i multiplikacija po izdanku) te indeks vitrifikacije (20%).
 10. Rezultati našeg istraživanja sugeriraju da postoji potencijal u primjeni nanočestica SiO₂ ali i biljnog regulatora floroglucinola u smanjenju vitrifikacije izdanka borovnice pri uzgojnim uvjetima TIB/TIS bioreaktora na tekućem hranjivom mediju. Usavršavanje protokola neophodno je za određivanje preciznijih koncentracija silicija u obliku nano frakcije SiO₂, kao i drugih kemijskih oblika silicija.
 11. S obzirom na različit mehanizam djelovanja, mogućnost dodatne optimizacije protokola trebalo bi usmjeriti putem „split“ (podijeljene) primjene. Potrebno je ispitati mogućnost primjene nano-SiO₂ u početnoj fazi aklimatizacije prilikom uspostavljanja ravnoteže rasta (do 20-tog dana kultivacije) te modifikaciju medija floroglucinolom u kasnijoj fazi kultivacije. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na potencijal ispitivanja učinka viših koncentracija nano-SiO₂ od 80 mg/L dok nam niža koncentracija nano-ZnO (1 mg/L) pojedinačno i/ili u kombinaciji s floroglucinolom (40 mg/L) predstavlja gornju granicu moguće primjene u budućim istraživanjima.

6. LITERATURA

1. Abd-elsalam, K.A. (2013.): Nanoplatforms for plant pathogenic fungi management. *Fungal Genomics Biol* 2 : e107.
2. Abdel-Haliem, M.E., Hegazy, H.S., Hassan, N.S., Naguib, D.M. (2017.): Effect of silica ions and nano silica on rice plants under salinity stress. *Ecological Engineering*, 99, 282-289.
3. Adelberg, J.W., Simpson, E.P. (2002.): Intermittent Immersion Vessel Apparatus and Process for Plant Propagation. Internl. S/N: PCT/US01/06586.
4. Afreen, F. (2006.): Temporary immersion bioreactor. In: Gupta SD, Ibaraki Y (eds) *Plant tissue culture engineering*. Springer, Dordrecht, pp 187–201.
5. Agarie, S., Agata, W., Kubota, F., Kaufman, P.B. (1992.): Physiological roles of silicon in photosynthesis and dry matter production in rice plants: I. Effects of silicon and shading treatments. *Jpn. J.Crop Sci.* 61, 200–206.
6. Agarie, S., Hanaoka, N., Ueno, O., Miyazaki, A., Kubota, F., Agata, W. (1998.): Effects of silicon on tolerance to water deficit and heat stress in rice plants (*Oryza sativa* L.), monitored by electrolyte leakage. *Plant Prod. Sci.* 1, 96–103.
7. Ahmad, M.A., Javed, R., Adeel, M., Rizwan, M., Ao, Q., Yang, Y. (2020.): Engineered ZnO and CuO nanoparticles ameliorate morphological and biochemical response in tissue culture regenerants of candyleaf (*Stevia rebaudiana*). *Molecules*, 25(6), 1356.
8. Ahn, G., Kim, K., Cha, S., Song, C., Lee, J., Heo, M., Yeo, I., Lee, N., Jee, Y., Kim, J., Heu, M., Jeon, Y. (2007.): Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H₂O₂-mediated DNA damage. *Eur Food Res Technol* 226:71–79.
9. Aitken-Christie, J. (1995.): Automation in plant tissue culture-general introduction and overview. In: *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture.*, J. Aitken-Christie, T. Kozai, M.A.L. Smith (Editors). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherland. Pp 1- 12.
10. Aken Van, B. (2015.): Gene expression changes in plants and microorganisms exposed to nanomaterials. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 206e219.
11. Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y., Çiftçi, Y.O. (2014): Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117(1): 65-76.

12. Albarran, J., Bertrand, B., Lartaud, M., Etienne, H. (2005.): Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81(1): 27-36.
13. Alharby, H.F., Metwali, E.M.R., Fuller, M.P., Aldhebani, Y.A. (2016.): Impact of application of zinc oxide nanoparticles on callus induction, plant regeneration, element content and antioxidant enzyme activity in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under salt stress. *Arch Biol Sci* 68:723–735.
14. Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y. (2001.): A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411, 1053–1057.
15. Al-Maarri, K., Al-Ghamdi, A.S. (2000.): Factors affecting the incidence of vitrification of *in vitro* propagated fruit trees. *J King Saud Univ* 8:139–149.
16. Álvarez, S.P., Tapia, M.A.M., Vega, M.E.G., Ardisana, E.F.H., Medina, J.A.C., Zamora, G.L.F., Bustamante, D.V. (2019.): Nanotechnology and plant tissue culture. In *Plant Nanobionics* (pp. 333-370). Springer, Cham.
17. Ammirato, P.V., Styer, D.J. (1985.): Strategies for large scale manipulation of somatic embryos in suspension culture. In: *Biotechnology in plant science: Relevance to agriculture in the eighties*, Zaitlin, M., Day, P. and Hollaender, A. (Editors), Academic Press, New York. Pp. 161–178.
18. Apel, K., Hirt, H. (2004.): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
19. Aremu, A.O., Masondo, N.A., Rengasamy, K.R., Amoo, S.O., Gruz, J., Bíba, O., Šubrtová, M., Pěňčík, A., Novák, O., Doležal, K., Van Staden, J. (2015.): Physiological role of phenolic biostimulants isolated from brown seaweed *Ecklonia maxima* on plant growth and development. *Planta*. 241(6): 1313-24.
20. 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 Science*, 175, 487–496.
21. Arencibia, A.D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B., Bravo, C., Garcia- Gonzales, R. (2013.): An approach for micropropagation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)

-
- plants mediated by temporary immersion bioreactors (TIBs). *Am J Plant Sci* 4:1022–1028.
22. Ascencio-Cabral, A., Gutiérrez-Pullido, H., Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A. (2008.): Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Sci Hort* 118:155–160.
23. Asmar, S.A., Castro, E.M., Pasqual, M., Pereira, F.J., Soares, J.D.R. (2013): Changes in leaf anatomy and photosynthesis of micropropagated banana plantlets under different silicon sources. *Scientia Horticulturae*, 161, 328-332.
24. Athanasas, K., Magiatis, P., Fokialakis, N., Skaltsounis, A-L, Pratsinis, H., Kletsas, D. (2004.): Hyperjovinols A and B: two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum jovis* with antioxidant activity in cell cultures. *J Nat Prod* 67:973–977.
25. Avestan, S., Naseri, L.A., Hassanzade, A., Sokri, S.M., Barker, A.V. (2015.): Effects of nanosilicon dioxide application on *in vitro* proliferation of apple rootstock. *Journal of Plant Nutrition*, 39(6), 850-855.
26. Bairwa, V.K., Kachhwaha, S., Kothari, S.L. (2012.): Phloroglucinol Mediated Shoot Bud Elongation in *Capsicum annuum* L. *National Academy Science Letters*, 35(4), 331-335.
27. Bao-shan, L., Shao-qi, D., Chun-hui, L., Li-jun, F., Shu-chun, Q., Min, Y. (2004.): Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings. *J Forest Res* 15:138–140.
28. Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Job, N., Tandon, P. (2015.): Phyto-molecular profiling and assessment of antioxidant activity within micropropagated plants of *Dendrobium thyrsiflorum*: a threatened, medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 535-550.
29. Bendini, A., Cerretani, L., Pizzolante, L., Toschi, T.G., Guzzo, F., Ceoldo, S., Levi, M. (2006.): Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. *European Food Research and Technology*, 223(1), 102-109.
30. Bendritter, M., Maupoil, V., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Rochette, L. (1998.): Studies by electron paramagnetic resonance of the importance of iron in the hydroxyl scavenging properties of ascorbic acid in plasma: effects of iron chelators. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 12: 510-516.
-

-
31. Beruto, M., Beruto, D., Debergh, P. (1999.): Influence of agar on *in vitro* cultures: I. Physicochemical properties of agar and agar gelled media. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35: 86–93
 32. Blevins, D.G., Lukaszewski, K.M. (1998.): Boron in plant structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 95-122.
 33. Bošnjak, D., Marković, M., Agić, D., Vinković, T., Tkalec Kojić, M., Ravnjak, B., Stanisavljević, A. (2021.): The Influence of Nutrient Media Modification on the Morphological Parameters in Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Micropropagation in the Liquid and Semi-solid Media. *Poljoprivreda*, 27 (1), 22-29.
 34. Bouman, H., Tiekstra, A. (2005.): Adaptations of the mineral composition of tissue culture media on the basis of plant elemental analysis and composition of hydroponic substrates. In: Hvoslef-Eide, A.K. and Preil W. (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht. Pp 493-505.
 35. Boxus, P., Druart, P., Brasseur, E. (1978.): Rapport d'Activites du Centre de Recherches agronomiques de Gembloux : pp. 126-127.
 36. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995.): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmit Wissen Tech* 28: 25-30
 37. Braga, F.T., Nunes, C.F., Favero, A.C., Pasqual, M., Carvalho, J.G., Castro, E.M. (2009.): Anatomical characteristics of the strawberry seedlings micropropagated using different sources of silicon. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 44, 128–132.
 38. Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A. (2007.): Zinc in plants. *New phytologist*, 173(4), 677-702.
 39. Burklew, C.E., Ashlock, J., Winfrey, W.B., Zhang, B., (2012.): Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and micro RNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *PLoS One* 7, e34783.
 40. Burman, U., Saini, M., Kumar, P. (2013.): Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Antioxidant System of Chickpea Seedlings. *Toxicological and Environmental Chemistry* 95 (4): 605–612.
 41. Businge, E., Trifonova, A., Schneider, C., Rödel, P., Egertsdotter, U. (2017.): Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of eucalyptus, birch and fir. *Forests* 8(196):1-9.
-

-
42. Cardoso, J.C., Teixeira da Silva, J.A. (2012.): Micropropagation of gerbera in culture medium sterilized with liquid chlorine dioxide (ClO₂). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 48:362–368.
 43. Ceasar, A.S., Maxwell, L.S., Prasad, B.K., Karthigan, M., Ignacimuthu, S. (2010.): Highly efficient shoot regeneration of *Bacopa monnieri* (L.) using a two-stage culture procedure and assessment of genetic integrity of micropropagated plants by RAPD. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(3), 443-452.
 44. Chakmak, I. (2000.): Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen. *New Phytologist*, 146(2), 185-205.
 45. Chakrabarty, D., Park, S., Ali, M., Shin, K., Paek, K. (2006.): Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiol* 26(3):377–388.
 46. Chakrabarty, D., Dewir, Y.H., Hahn, E.J., Datta, S.K., Paek, K.Y. (2007.): The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock ‘M9 EMLA’ in temporary versus continuous immersion bioreactors. *Plant Growth Regulation*, 51(1), 11-19.
 47. Chen, R., Ratnikova, T.A., Stone, M.B., Lin, S., Lard, M., Huang, G. (2010.): Differential uptake of carbon nanoparticles by plant and mammalian cells. *Small* 6, 612e617.
 48. Cheniany, M., Ebrahimzadeh, H., Vahdati, K., Preece, J.E., Masoudinejad, A., Mirmasoumi, M. (2013.): Content of different groups of phenolic compounds in microshoots of *Juglans regia* cultivars and studies on antioxidant activity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(2), 443-450.
 49. Chérif, M., Bélanger R.R. (1992.): Use of potassium silicate amendments in recirculating nutrient solutions to suppress *Pythium ultimum* on Long English Cucumber. *Plant Disease* 76(10): 1008-1011.
 50. Chérif, M., Benhamou, N., Menzies, J.G., Bélanger, R.R. (1992.): Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 41(6), 411-425.
 51. Christiernin, M., Ohlsson, A., Berglund, T., Henriksson, G. (2005.): Lignin isolated from primary walls of hybrid aspen cell cultures indicates significant differences in lignin structure between primary and secondary cell wall. *Plant Physiol Biochem* 43:777–785.
-

-
52. Chutipajit, S., Whalley, A.J., Sutjaritvorakul, T. (2018.): *In vitro* plant growth promotion by ZnO nanomaterials in indica rice seedlings (*Oryza sativa* L.). *Materials Today: Proceedings*, 5(7), 14944-14949.
 53. Cifuentes, Z., Custardoy, L., dela Fuente, J.M., Marquina, C., Ibarra, M.R., Rubiales, D. (2010.): Absorption and translocation to the aerial part of magnetic carbon-coated nanoparticles through the root of different crop plants. *J. Nanobiotechnol.* 8, 26.
 54. Conklin, P.L., Saracco, S.A., Norris, S.R., Last, R.L. (2000.): Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics*, 154(2), 847-856.
 55. Crockett, S., Wenzig, E., Kunert, O., Bauer, R. (2008.): Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. *Phytochem Lett* 1:37–43.
 56. Dahleen, L.S. (1995.): Improved plant regeneration from barley cultures by increased copper levels. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 43, 267-269.
 57. Dakora, F.D., Nelwamondo, A. (2003.): Silicon nutrition promotes root growth and tissue mechanical strength in symbiotic cowpea. *Funct Plant Biol* 30: 947–953.
 58. Davis, M.J., Baker, R., Hanan J.J. (1977.): Clonal multiplication of carnation by micropropagation. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 102 : 48-53.
 59. Debergh, P., Maene, L. (1984.): Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. *Parasitica* 40:69–75.
 60. Debnath, S. (2011.): Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation. *Can J Plant Sci* 91:147–157.
 61. De Klerk, G.J., Guan, H., Huisman, P., Marinova, S. (2011.): Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus* ‘Jork 9’. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 175-185.
 62. De Klerk, G.J., Wijnhoven, F. (2005.): Water retention capacity of tissue-cultured plants: performance of leaves from *in vitro* germinated mungbean seedlings. *Propagation of ornamental plants*, 5(1), 14-8.
 63. de la Rosa, G., Lopez-Moreno, M.L., de Haro, D., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. (2013.): Effects of ZnO nanoparticles in alfalfa, tomato, and cucumber at the germination stage: root development and X-ray absorption spectroscopy studies. *Pure Appl Chem* 85(12):2161–2174.
 64. Dewir, Y.H., Indoliya, Y., Chakrabarty, D., Paek, K.Y. (2014.): Biochemical and physiological aspects of hyperhydricity in liquid culture system. In *Production of*
-

- biomass and bioactive compounds using bioreactor technology (pp. 693-709). Springer, Dordrecht.
65. Devlin, R.M. (1975.): Plant Physiology. 3rd. Edition. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
66. Dianzani, M.U., Barrera, G. (2008.): Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. Free radical pathophysiology, 19-38.
67. Du, W., Sun, Y., Ji, R., Zhu, J., Wu, J., Guo, H. (2011.): TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. Journal of environmental monitoring, 13(4), 822-828.
68. Dutra, L.F., Wendling, I., Brondani, G.E. (2009.): A micropropagação de eucalipto (The micropropagation of eucalyptus). Pesquisa Florestal Brasileira 58:49-59.
69. Dutta, S., Mitra, M., Agarwal, P., Mahapatra, K., De, S., Sett, U., Roy, S. (2018.): Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. Plant Signal. Behav. 2018, 1–49.
70. El-Kady, M.E., El-boray, M., Shalan, A.M., Mohamed, L.M. (2017.): Effect of Silicon Dioxide Nanoparticles on Growth Improvement of Banana Shoots *In Vitro* within Rooting Stage. Journal of Plant Production 8(9):913-916.
71. El-Mahdy, M.T., Elazab, D.S. (2020.): Impact of Zinc Oxide Nanoparticles on Pomegranate Growth under *In Vitro* Conditions. Russ J Plant Physiol 67, 162–167.
72. El-Temsah, Y.S., Joner, E.J. (2012.): Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. Environ. Toxicol. 27 (1), 42e49.
73. Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y., Zheng, X., Wang, Y. (2020.): Silicon dioxide nanoparticles improve plant growth by enhancing antioxidant enzyme capacity in bamboo (*Pleioblastus pygmaeus*) under lead toxicity. Trees, 34(2), 469-481.
74. EN13037: Determination of pH. 1999. (2011.)
75. EN13038: Determination of electrical conductivity. (2011.)
76. EN13040: Sample preparation for chemical and physical test, determination of dry matter content, moisture content and laboratory compacted bulk density. 1999. (2007.)
77. Epstein, E. (1971.): Mineral Nutrition of Plants. Principles and Perspectives. John Wiley and Sons Inc., New York, London, Sydney, Toronto.
78. Epstein, E. (1999.): Silicon. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology 150:641–664.

-
79. Escalona, M., Lorenzo, J.C., Gonzales, B.L., Daquinta, M., Borroto, C.G., Gozales, J.I., Desjardine, Y. (1999.): Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion system. *Plant Cell Report*, (18): 743–748.
80. Etienne, H., Lartaud, M., Michaux-Ferrière, N., Carron, M.P., Berthouly, M., Teisson, C. (1997.): Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Muñ. Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cellular and Developmental Biology of Plant*, (33): 81–87.
81. Etienne, H., Berthouly, M. (2002.): Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69:215-231.
82. Etienne, H., Dechamp, E., Etienne, B.D., Bertrand, B. (2006.): Bioreactors in coffee micropropagation. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, (18): 2-3.
83. Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, Y., Khan, S.T., Hayat, S. (2018.): Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica* 2018, 56, 678–686.
84. Fam, S.S., Morrow, J.D. (2003.): The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Current medicinal chemistry*, 10(17), 1723-1740.
85. Farhangi-Abriz, S., Torabian, S. (2018.): Nano-silicon alters antioxidant activities of soybean seedlings under salt toxicity. *Protoplasma*, 255(3), 953-962.
86. Galla, G., Zenoni, S., Marconi, G., Marino, G., Botton, A., Pinosa, F., Citterio, S., Ruperti, B., Palme, K., Albertini, E., Pezzotti, M., Mau, M., Sharbel, T.F., De Storme, N., Geelen, D., Barcaccia, G. (2011.): Sporophytic and gametophytic functions of the cell cycle-associated *Mob1* gene in *Arabidopsis thaliana* L. *Gene* 484:1–12.
87. Galdiano, R.F.Jr., Lemos, E.G.M., Faria, R.T., Vendrame, W.A. (2012.): Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Sci Hort* 148:154–160.
88. Gao, H., Xia, X., An, L., Xin, X., Liang, Y. (2017.): Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO₃ and its associated mechanism during *in vitro* culture. *Plant Sci* 254:1–11.
89. Gao, H., Xu, D., Zhang, H., Cheng, X., Yang, Q. (2020.): Effects of culture medium composition and PEG on hyperhydricity in *Dendrobium officinale*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56(2), 143-149.
90. Gao, X., Zou, C., Wang, L., Zhang, F. (2006.): Silicon decreases transpiration rate and conductance from stomata of maize plants. *Journal of Plant Nutrition*, 29(9), 1637-1647.
-

-
91. García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., Fernández, M.D. (2017.). Comparative effect of ZnO NPs, ZnO bulk and ZnSO₄ in the antioxidant defences of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse conditions. *Science of the Total Environment*, 589, 11-24.
 92. Garcia-Sanchez, S., Bernales, I., Cristobal, S. (2015.): Early response to nanoparticles in the *Arabidopsis* transcriptome compromises plant defence and root-hair development through salicylic acid signalling. *BMC Genom.* 16, 341.
 93. Gaschler, M.M., Stockwell, B.R. (2017.): Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419-425.
 94. Gaspar, T., Kevers, C. (1985.): Cobalt prevention of vitrification process in carnation. *Plant Physiol*, 77(13), 11.
 95. George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (2010.): The growth regulatory effects of phenols. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (eds.) *Plant propagation by tissue culture*, 3rd edn. Springer, The Netherlands, pp 192–196.
 96. George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J.D. (2008.): *Plant Tissue Culture Procedure - Background*. In: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J.D. (eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht.
 97. Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T. (2014.): Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng Life Sci* 14:607–621.
 98. Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2000.): Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11), 1106-1114.
 99. Gianguzzi, V., Inglese, P., Barone, E., Sottile, F. (2019.): *In Vitro* Regeneration of *Capparis spinosa* L. by Using a Temporary Immersion System. *Plants* 8(6):177.
 100. Gill, S.S., Tuteja, N. (2010.): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
 101. Gillman, J.H., Zlesak, D.C., Smith, J.A. (2003.): Applications of potassium silicate decrease black spot infection in *Rosa hybrida* 'Meipelta' (Fuschia Meidiland™). *HortScience* 38(6):1144-1147.
 102. Giraldo, J.P., Landry, M.P., Faltermeier, S.M., McNicholas, T.P., Iverson, N.M., Boghossian, A.A., Reuel, N.F., Hilmer, A.J., Sen, F., Brew, J.A., Strano, M.S. (2014.):
-

- Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing. *Nat Mater.*
103. Gosh, C., Halbwrith, H., Stich, K. (2010.): Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 71:838–843.
 104. Gómez-Kosky, R., Armas, P.M., Calimano, M.B., Villegas, A.B., Otero, Y., Jaramillo, D.N., Pérez, L.P. (2021.): Effect of Phloroglucinol on *in Vitro* Rooting of Sugarcane (*Saccharum* spp. cv C90-469). *Sugar Tech*, 23(2), 466-471.
 105. Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S., Zhang, C. (2005.): Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Sci.* 169, 309–314.
 106. González, M.E., Castilla, Y., Hernández, A. (2011.): Obtención de suspensiones celulares y embriones somáticos de café (*Coffea canephora* P.), con el empleo de metabolitos bacterianos. *Rev Colomb Biotecnol* 13(1):123–131.
 107. Gunes, A., Inal, A., Bagci, E.G., Coban, S., Pilbeam, D.J. (2007.): Silicon mediates changes to some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown under B toxicity. *Sci. Hortic.* 113, 113–119.
 108. Gururaj, H.B., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. (2004.): Efficient clonal propagation method for *Decalepis hamiltonii*, an endangered shrub, under the influence of phloroglucinol. *Indian J. Exp. Biol.* 42: 424-428.
 109. Haberlandt, G. (1902.): Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *SITZ-Ber Mat-Nat Kl Kais Akad Wiss (Wien)* 111(1):69–92.
 110. Habibi, G. (2016.): Effect of foliar-applied silicon on photochemistry, antioxidant capacity and growth in maize plants subjected to chilling stress. *Acta agriculturae Slovenica*, 107(1), 33-43.
 111. Haghghi, M., Afifipour, Z., Mozafarian, M. (2012.): The effect of N-Si on tomato seed germination under salinity levels. *J Biol Environ Sci* 6:87–90.
 112. Haghghi, M., Pessarakli, M. (2013.): Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Scientia Horticulturae*, 161, 111-117.
 113. Haichar, F.Z., Heulin, T., Guyonnet, J., Achouak, W. (2016.): Stable isotope probing of carbon flow in plant-holobionte, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 41, pp. 9-13.

-
114. Hammatt, N. (1994.): Promotion by phloroglucinol of adventitious root formation in micropropagated shoots of adult wild cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Growth Regul* 14:127–132.
115. Hamon, S., Anthony, F., Barre, P.H., Berthaud, J., Boursot, M., Chabrillange, N., Ky, C.L., Combes, M.C., Couturon, E., Cros, J., Dussert, S., Engelmann, F., Lashermes, P., Le Pierres, D., Louarn, J., Noirot, M., Recalt, C., Trouslot, P., Charrier, A. (1998.): Coffee genetic resources and biotechnologies: their putative uses for breeding. *Cahiers Agricultures* 7:480–487.
116. Handreck, K.A., Jones, L.H.P. (1968.): Studies of silica in the oat plant. *Plant Soil* 29, 449–459.
117. Hakkaart, F.A., Versluijs, J.M. (1983.): Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. *Neth J. Plant Path.* 89 : 47-5.
118. Harborne, J.B. (1973.): Phenolic compounds. In *Phytochemical methods* (pp. 33-88). Springer, Dordrecht.
119. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Anee, T. I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J. A., & Fujita, M. (2019). Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, 8(9), 384.
120. Hashemi, S., Asrar, Z., Pourseyedi, S., Nadernejad, N. (2019.): Investigation of ZnO nanoparticles on proline, anthocyanin contents and photosynthetic pigments and lipid peroxidation in the soybean. *IET nanobiotechnology*, 13(1), 66-70.
121. Hänsch, R., Mendel, R.R. (2009.): Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3), 259-266.
122. Hezaveh, T.A., Pourakbar, L., Rahmani, F., Alipour, H. (2019.): Interactive effects of salinity and ZnO nanoparticles on physiological and molecular parameters of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 50(6), 698-715.
123. Hegedus, P., Phan, C.T. (1983.): Action de phenols sur les malformations observees chez les portegreffes de pommiers M-26 et 0-3 cultives ill vitro, *Rev Can BioI Exp* 42: 33-38.
124. Helaly, M.N., El-Metwally, M.A., El-Hoseiny, H., Omar, S.A., El-Sheery, N.I. (2014.): Effect of nanoparticles on biological contamination of *in vitro* cultures and organogenic regeneration of banana. *Aust J Crop Sci* 8:612–624.
-

-
125. Hongyang, G., Jiawei, L., Huining, J., Lijia, A., Xiuying, X. (2017.): Hyperhydricity-induced ultrastructural and physiological changes in blueberry (*vaccinium* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2017.
 126. Howladar, S.M. (2019.): Nano-zinc Oxide Effects on Eggplant Transplantquality in Comparison With Conventional Zinc Oxide. 9th International Conference for Sustainable Agricultural Development 4-6 March 2019. Fayoum J. Agric. Res,&Dev., Vol.33 No. 1(B) March, 2019.
 127. Hsu, Y.T., Kao, C.H. (2007.): Cadmium-induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines. *Plant and Soil*, 291(1), 27-37.
 128. Huang, M.H., Mao, S., Feick, H., Yan, H., Wu, Y., Kind, H., Weber, E., Russo, R., Yang, P. (2001.): Room – temperature ultraviolet nanowire nanolasers. *Science* 292:1897–1899.
 129. Hussain, M., Raja, N.I., Iqbal, M., Ejaz, M., Yasmeen, F. (2017.): *In vitro* germination and biochemical profiling of *Citrus reticulata* in response to green synthesized zinc and copper nanoparticles, *IET Nanobiotechnol.*, vol. 117, p. 790.
 130. Ibrahim, O.H. (2020.): Developing air layering practices for propagation of *Dracaena marginata* Lam. utilizing phloroglucinol and seaweed extract as IBA-synergists or alternatives. *Scientific Journal of Flowers and Ornamental Plants*, 7(2), 185-197.
 131. Israel García-López, J., Lira-Saldivar, R.H., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Niño-Medina, G., Angélica Ruiz-Torres, N., Díaz-Barriga, E. (2018.): Effects of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant enzymes of *Capsicum chinense*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 100(5-7), 560-572.
 132. Ivanova, M., Staden, J.V. (2011.): Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 104(1):13–21.
 133. Jain, D., Kumar-Daima, H., Kachhwaha, S., Kothari, S.L. (2009.): Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Dig J Nanomater Biostruct* 4:557–563.
 134. Jain, R., Sinha, A., Kachhwaha, S., Kothari, S.L. (2009.): Micropropagation of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal: a critically endangered medicinal herb. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18(2), 249-252.
-

-
135. James, D.J., Knight, V.H., Thurbon, I.J. (1980.): Micropropagation of red raspberry and the influence of phloroglucinol. *Sci Hort* 12:313–319.
 136. James, D.J., Thurbon, I.J. (1979.): Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M.9. *J Hort Sci* 54:309–311.
 137. Javed, R., Yucesan, B., Zia, M., Gurel, E. (2018.): Elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown under ZnO and CuO nanoparticles stress. *Sugar Tech*, 20(2), 194-201
 138. Jia, W., Zhang, J. (2008.): Stomatal movements and long-distance signaling in plants. *Plant Signal Behav* 3(10):772–777.
 139. Jones, O.P., Hatfield, S.G.S. (1976.): Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. *J Hort Sci* 51:495–549.
 140. Kah, M., Hofmann, T. (2014.): Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environ. Int.* 63, 224e235.
 141. Kalteh, M., Alipour, Z.T., Ashraf, S., Aliabadi, M.M., Nosratabadi, A.F. (2014.); Effect of silica nanoparticles on basil (*Ocimum basilicum*) under salinity stress. *J Chem Health Risks* 4:49–55.
 142. Kamenidou, S., Cavins, T.J., Marek, S. (2010.): Silicon supplements affect floricultural quality traits and elemental nutrient concentrations of greenhouse produced gerbera. *Scientia Horticulturae* 123(3):390-394.
 143. Karami Mehrian, S., Lima, R. (2016.): Nanoparticles cyto and genotoxicity in plants: mechanisms and abnormalities. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 6, 184e193.
 144. Karimi, J., Mohsenzadeh, S. (2016.): Effects of silicon oxide nanoparticles on growth and physiology of wheat seedlings. *Russ J Plant Physiol* 63, 119–123 (2016).
 145. Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011.): Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6), 709-725.
 146. Kaveh, R., Li, Y.-S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C.L., Van Aken, B. (2013.): Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10637e10644.
 147. Kevers, C., Franck, T., Strasser, R.J., Dommès, J., Gaspar, T. (2004.): Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 77(2):181–191.
-

-
148. Kevers, C., Prat, R., Gaspar, T. (1987.): Vitrification of carnation *in vitro*: changes in cell wall mechanical properties, cellulose and lignin content. *Plant Growth Regul* 5(1):59–66.
 149. Khaliq, A., Ali, S., Hameed, A., Farooq, M.A., Farid, M., Shakoor, M.B., (2016.): Silicon alleviates nickel toxicity in cotton seedlings through enhancing growth, photosynthesis, and suppressing Ni uptake and oxidative stress. *Arch Agron Soil Sci* 62: 633–647.
 150. Khodakovskaya, M.V., de Silva, K., Biris, A.S., Dervishi, E., Villagarcia, H. (2012.): Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano* 6(3):2128–2135.
 151. Khudsar, T., Iqbal, M., Sairam, R.K. (2004.): Zinc-induced changes in morpho-physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua*. *Biologia plantarum*, 48(2), 255-260.
 152. Kim, D.H., Gopal, J., Sivanesan, I. (2017.): Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC advances*, 7(58), 36492-36505.
 153. Kim, H., Roh, H., Lee, H.J., Chung, S.Y., Choi, S.O., Lee, K.R., Han, S.B. (2003.): Determination of phloroglucinol in human plasma by high performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr* 792:307–312.
 154. Kim, J., Soh, S.Y., Bae, H., Nam, S.Y. (2019.): Antioxidant and phenolic contents in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and micropropagated potatoes. *Applied Biological Chemistry*, 62(1), 1-9. h
 155. Kim, Y.S. (2006.): Conservation of plant diversity in Korea. *Landscape Ecol Eng* 2:163–170.
 156. Kintzios, S., Drossopoulos, J.B., Iymperopoulos, C. (2001.): Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 67, 55-62.
 157. Kong, C., Kim, J., Yoon, N., Kim, S. (2009.): Induction of apoptosis by phloroglucinol derivative from *Ecklonia cava*. *Food Chem Toxicol* 47:1653–1658.
 158. Kooi, L.T., Keng, C.L., Kheng, C.T. (1999.): *In vitro* rooting of Sentang shoots (*Azadirachta excelsa* L.) and acclimatization of the plantlets. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35:396–400.
 159. Kotíková, Z., Lachman, J., Hejtmánková, A., Hejtmánková, K. (2011.): Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of
-

- mutual interactions between antioxidants. *LWT-Food Science and Technology*, 44(8), 1703-1710.
160. Kousalya, L., Bai, V.N. (2016.): Effect of growth regulators on rapid micropropagation and antioxidant activity of *Canscora decussata* (Roxb.) Roem. & Schult.–A threatened medicinal plant. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(2), 161-170.
161. Krämer, U. (2010): Metal hyperaccumulation in plants. *Annual review of plant biology*, 61(1), 517-534
162. Kreutmeier, C., Gebhardt, K., Paul, L., Feucht, W. (1984.): The effect of MgSO₄ and CaCl₂ on regeneration of shoot tip cultures of *Prunus cerasus in vitro*, *Gartenbauwissenschaft* 49: 204-212.
163. Kumar, V., Gururaj, H.B., Narasimha Prasad, B.C., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. (2005.): Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annum* L. *Sci Hort* 106:237–246.
164. Kurepa, J., Paunesku, T., Vogt, S., Arora, H., Rabatic, B.M., Lu, J. (2010.): Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO₂ Alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano Lett.* 10, 2296e2302.
165. Lalarukh, I., Zahra, N., Al Huqail, A.A., Amjad, S.F., Al-Dhumri, S.A., Ghoneim, A.M., Abdelhafez, A.A. (2022.): Exogenously applied ZnO nanoparticles induced salt tolerance in potentially high yielding modern wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Environmental Technology & Innovation*, 27, 102799.
166. Larson, R.A. (1988.): The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4), 969-978.
167. Latef Abdel, A.A.H., Abu Alhmad, M.F., Abdelfattah, K.E. (2017). The possible roles of priming with ZnO nanoparticles in mitigation of salinity stress in lupine (*Lupinus termis*) plants. *Journal of plant growth regulation*, 36(1), 60-70.
168. Le Bot, J., Adamowicz, S., Robin, P. (1998.): Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. *Sci.Hortic.* 74: 47±82.
169. Lee, S., Kim, S., Kim, S., Lee, I. (2013.): Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 848-854.
170. Leffring, L. (1983.): Vegetatieve vermeerdering van *Nerine bowdenii in vitro*. Goede resultaten ook na achtmaal doorvermeerderen. *Vakbl. Bloemist.* 40: 32–25.

-
171. Leifert, C., Murphy, K.P., Lumsden, P.J. (1995.): Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2), 83-109.
 172. Letouze, R., Daguin, F. (1983.): Manifestation spontanee et aleatoire d'une croissance anormale en culture in Recherche de marqueurs metaboliques. *Rev. Can. Biol. Exp.* 42 : 23-28.
 173. Levin, R., Stav, R., Alper, Y., Watad, A.A. (1998.): A technique for repeated non-axenic subculture of plant tissues in a bioreactor on liquid medium containing sucrose. *Plant Tissue Culture Biotechnology*, (3):41-45.
 174. Lewis, D.H. (1980.): Boron, lignification and the origin of vascular plants - a unified hypothesis. *New Phytol.* 84, 209-229.
 175. Li, B., Tao, G., Xie, Y., Cai, X. (2012.): Physiological effects under the condition of spraying nano-SiO₂ onto the *Indocalamus barbatus* McClure leaves. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 36(4), 161-164.
 176. Li, T., Yun, Z., Zhang, D., Yang, C., Hong, Z., Jiang, Y., Duan, X. (2015.): Proteomic analysis of differentially expressed proteins involved in ethylene-induced chilling tolerance in harvested banana fruit. *Front Plant Sci* 6(845):845.
 177. Liang, Y., Chen, Q.I.N., Liu, Q., Zhang, W., Ding, R. (2003.): Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of plant physiology*, 160(10), 1157-1164.
 178. Liu, J.J., Lin, S.H., Xu, P.L., Wang, X.J., Bai, J.G. (2009.): Effects of exogenous silicon on the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in chilling-stressed cucumber leaves. *Agricultural Sciences in China*, 8(9), 1075-1086.
 179. Lyam, P.T., Musa, M., Jamaledine, Z., Okere, U.A., Odofin, W.T. (2012.): Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) potential in meeting crop production demand in Nigeria. *Journal of Biology and Life Sciences*, 3(1), 66-86.
 180. Liang, Y., Sun, W., Zhu, Y.G., Christie, P. (2007.): Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. *Environmental pollution*, 147(2), 422-428.
 181. Liang, Y.C., Sun, W.C., Zhu, Y.G., Christie, P. (2006.): Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environmental Pollution*. (147), 422-428.
 182. Lichtenthaler, H.K. (1987.): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 350-382.
-

-
183. Lin Bao, S., Qi, D.S., Hui, L.C., Jun, F.L., Chun, Q.S., Min, Y. (2004.): Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings. *Journal of Forestry Research* 15(2):138-140.
184. Lim, M.Y., Lee, E.J., Jana, S., Sivanesan, I., Jeong, B.R. (2012.): Effect of potassium silicate on growth and leaf epidermal characteristics of begonia and pansy grown *in vitro*. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 30(3):579-585.
185. Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J. (2009.): Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano Lett.* 9, 1007e1010.
186. Lloyd, G., McCown, B. (1981.): Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30: 421–427.
187. Locarno, M., Fochi, C.G., de Oliveira Paiva, P.D. (2011.): Influence of silicate fertilization on chlorophylls of rose leaves. *Ciencia e Agrotechnologia* 35(2):287-290.
188. Lotfi, M., Bayouhd, C., Werbrouck, S., Mars, M. (2020.): Effects of meta-topolin derivatives and temporary immersion on hyperhydricity and *in vitro* shoot proliferation in *Pyrus communis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-7.
189. Loh, C., Ingram, D. (1982.): Production of haploid plants from anther cultures and secondary embryoids of winter oilseed rape, *Brassica napus ssp. oleifera*. *New Phytol* 91:507–516.
190. Longnecker, N.E., Robson, A.D. (1993.): Distribution and transport of zinc in plants. In *Zinc in Soils and Plants*; Springer: Berlin, Germany, 1993; pp. 79–91.
191. Lu, C.M., Zhang, C.Y., Wen, J.Q., Wu, G.R., Tao, M.X. (2002.): Research on the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. *Soybean Sci* 21:68–172.
192. Lu, Z., Neumann, P.M. (1999.): Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in rice seedlings but not the transport of water via mercury-sensitive water channels in the root. *Plant Physiol.* 120, 143–152.
193. Ma, D., Sun, D., Wang, C., Qin, H., Ding, H., Li, Y., Guo, T. (2016.): Silicon application alleviates drought stress in wheat through transcriptional regulation of multiple antioxidant defense pathways. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(1), 1-10. ht
194. Ma, J.F., Yamaji, N. (2006.): Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends Plant Sci.* 11, 392–397.
-

-
195. Ma, J.F., Yamaji, N. (2008.): Functions and transport of silicon in plants. *Cellular and molecular life sciences*, 65(19), 3049-3057.
196. Mahajan, P., Dhoke, S.K., Khanna, A.S. (2011.): Effect of nano-ZnO particle suspension on growth of mung (*Vigna radiata*) and gram (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. *J Nanotechnol* 2011:1–7.
197. Mahendran, D., Geetha, N., Venkatachalam, P. (2019.): Role of silver nitrate and silver nanoparticles on tissue culture medium and enhanced the plant growth and development. In *In vitro* plant breeding towards novel agronomic traits (pp. 59-74). Springer, Singapore.
198. Mahmoud, L.M., Dutt, M., Shalan, A.M., El-Kady, M.E., El-Boray, M.S., Shabana, Y.M., Grosser, J.W. (2020.): Silicon nanoparticles mitigate oxidative stress of *in vitro*-derived banana (*Musa acuminata* ‘Grand Nain’) under simulated water deficit or salinity stress. *South African Journal of Botany*, 132, 155-163.
199. Mali, M., Aery, N.C. (2008.): Influence of silicon on growth, relative water contents, and uptake of silicon, calcium, and potassium in wheat grown in nutrient solution. *J. Plant Nutr.* 31, 1867–1876.
200. Manivannan, A., Soundararajan, P., Muneer, S., Ko, C.H., Jeong, B.R. (2016.): Silicon mitigates salinity stress by regulating the physiology, antioxidant enzyme activities, and protein expression in *Capsicum annum* ‘Bugwang’. *Biomed Res. Int.* 2016:3076357.
201. Manokari, M., Cokulraj, M., Priyadharshini, S., Badhepuri, M.K., Dey, A., Shekhawat, M.S. (2021.): Phloroglucinol improves morphometry, biochemical attributes and *ex vitro* growth of micropropagated plantlets of *Coccoloba uvifera* L., *Journal of Medicinally Active Plants* 10, (4):64-73.
202. Marschner, H., Possingham, J.V. (1975.): Effects of K and Na on the growth of leaf discs of sugar beet and spinach. *Z Pfl anzenphysiol* 75:6–16
203. Martínez, S., Gómez, R., Rodríguez, G., Veitía, N., Saucedo, O., Gil, V. (2016.): Morph agronomic characterization of grain sorghum variety CIAP 132R-05 plants regenerated via somatic embryogenesis under field conditions. *Centro Agrícola* 43(3):73–79.
204. Mattiello, E.M., Ruiz, H.A., Neves, J.C., Ventrella, M.C., Araújo, W.L. (2015.): Zinc deficiency affects physiological and anatomical characteristics in maize leaves. *Journal of plant physiology*, 183, 138-143.
-

-
205. Mengel, K., Kirkby, E.A. (1982.): Principles of Plant Nutrition. 3rd Edition. Internat. Potash Institute, Bern, Switzerland.
206. Meinzer, F.C., Grantz, D.A., Goldstein, G., Saliendra, N.Z. (1990.): Leaf water relations and maintenance of gas exchange in coffee cultivars grown in drying soil. *Plant Physiology*, 94(4), 1781-1787.
207. Ming, D.F., Pei, Z.F., Naeem, M.S., Gong, H.J., Zhou, W.J. (2012.): Silicon alleviates PEG-induced water-deficit stresses in upland rice seedlings by enhancing osmotic adjustment. *J. Agron. Crop Sci.* 198, 14–26.
208. Miralles, P., Johnson, E., Church, T.L., Harris, A.T. (2012.): Multiwalled carbon nanotubes in alfalfa and wheat, toxicology and uptake. *J. R. Soc. Interface* 9, 3514e3527.
209. Mordocco, A.M., Brumbley, J.A., Lakshmanan, P. (2009.): Development of a temporary immersion system (RITA[®]) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 45:450–457.
210. Montpetit, J., Vivancos, J., Mitani-Ueno, N., Yamaji, N., Rémus-Borel, W., Belzile, F. (2012.): Cloning, functional characterization and heterologous expression of TaLsi1, a wheat silicon transporter gene. *Plant Mol. Biol.* 79, 35–46.
211. Morikawa, C.K., Saigusa, M. (2004.): Mineral composition and accumulation of silicon in tissues of blueberry (*Vaccinium corymbosus* cv. Bluecrop) cuttings. *Plant and Soil*, 258(1), 1-8.
212. Mott, K.A., Sibbersen, E.D., Shope, J.C. (2008.): The role of the mesophyll in stomatal responses to light and CO₂. *Plant Cell Environ.* 31, 1299–1306.
213. Moussa, H.R. (2006.): Influence of exogenous application of silicon on physiological response of salt-stressed maize (*Zea mays* L.). *Int. J. Agric. Biol.* 8(3), 293-297.
214. Muneer, S., Soundararajan, P., Jeong, B.R. (2016.): Proteomic and antioxidant analysis elucidates the underlying mechanism of tolerance to hyperhydricity stress in *in vitro* shoot cultures of *Dianthus caryophyllus*. *J. Plant Growth Regul.* 35, 667–679.
215. Murashige, T., Skoog, F. (1962.): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant.*, 15(3): 473–497.
216. Mushtaq, Y.K. (2011.): Effect of nanoscale Fe₃O₄, TiO₂ and carbon particles on cucumber seed germination. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 46(14), 1732-1735.
217. Napierska, D., Thomassen, L.C.J., Lison, D., Martens, J.A., Hoet, P.H. (2010.): The nanosilica hazard: another variable entity. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 39.
-

-
218. Nas, M.N., Read, P.E. (2004.): A hypothesis for the development of a defined medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Sci. Hortic.* 101, 189-200.
219. Nemali, K.S., van Iersel, M.W. (2004.): Light intensity and fertilizer concentration: I. Estimating optimal fertilizer concentration from water-use efficiency of wax begonia. *HortScience* 39: 1287±1292.
220. Nikam, T.D., Mulye, K.V., Chambhare, M.R., Nikule, H.A., Ahire, M.L. (2019.): Reduction in hyperhydricity and improvement in *in vitro* propagation of commercial hard fibre and medicinal glycoside yielding *Agave sisalana* Perr. ex Engelm by NaCl and polyethylene glycol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138(1), 67-78.
221. Nirwan R.S., Kothari, S.L. (2003.): High copper levels improve callus induction and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39, 161-164.
222. Oertli, J.J., Grgurevic, E. (1974.): Effect of pH on the absorption of boron by excised embryos. *Agron. J.* 67, 278-280.
223. Odabas, M.S., Çirak, C. (2011.): Hypericum. *Med Aromat Plant Sci Biotech* 5(special issue 1):1–107.
224. Ojeda-Barrios, D., Abadía, J., Lombardini, L., Abadía, A., Vázquez, S. (2012.): Zinc deficiency in field-grown pecan trees: changes in leaf nutrient concentrations and structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1672-1678.
225. Oliveira, de.M.L., Xavier, A., Penchel, R.M., Santos, A.F. (2011.): *In vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* grown in semisolid medium and in temporary immersion bioreactor). *Scientia Forestalis*, 39(31):309-315.
226. Olmos, E., Hellín, E. (1998.): Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. *Sci Hortic* 75(1):91–101.
227. Pacheco, I., Buzea, C. (2018.). Nanoparticle uptake by plants: beneficial or detrimental?. In *Phytotoxicity of nanoparticles* (pp. 1-61). Springer, Cham.
228. Paek, K.Y., Chakrabarty, D., Hahn, E.J. (2005.): Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 81: 287–300.
229. Paek, K.Y., Hahn, E.J., Son, S.H. (2001.): Application of bioreactors of large scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* - Plant, 37: 149–157.
-

-
230. Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., Bansal, Y.K. (2015.): Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.
231. Pal Singh, I., Bharate, S.B. (2006.): Phloroglucinol compounds of natural origin. *Nat Prod Rep* 23:558–591.
232. Palmer, C.M., Guerinot, M.L. (2009.): Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature chemical biology*, 5(5), 333-340.
233. Patra, P., Choudhury, S.R., Mandal, S., Basu, A., Goswami, A., Gogoi, R., Gopal, M. (2013.): Effect sulfur and ZnO nanoparticles on stress physiology and plant (*Vigna radiata*) nutrition. In *Advanced nanomaterials and nanotechnology* (pp. 301-309). Springer, Berlin, Heidelberg.
234. Parida, A.K., Das, A.B. (2005.): Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
235. Persson, J. (2012.): Evaluation of a new type of temporary immersion system (TIS) bioreactors for plant micropropagation. Degree Project in the Horticultural Science Program. Swedish University of Agricultural Sciences
236. Pérez, L.P., Montesinos, Y.P., Olmedo, J.G., Rodriguez, R.B., Sánchez, R., Montenegro, O.N., Escriba, R.C.R., Daniels, D., Gómez-Kosky, R. (2016.): Effect of phloroglucinol on rooting and *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plants*. 52: 196–203.
237. Phan, C.T., Hegedus, P. (1986.): Possible metabolic basis for the developmental anomaly observed in *in vitro* culture, called ‘vitreous plants’. *Plant Cell Tissue Org Cult* 6:83–94.
238. Phan, C.T., Letouze, R. (1982.): A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents and of hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and vitreous plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*. *Plant Sci Lett* 31:323–327.
239. Piao, X.C., Chakrabarty, D., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2003.): A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Current Science* 1129-1132.
240. Pinedo-Guerrero, Z.H., Cadenas-Pliego, G., Ortega-Ortiz, H., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., Valdés-Reyna, J., Juárez-Maldonado, A. (2020.): Form of silica improves yield, fruit quality and antioxidant defense system of tomato plants under salt stress. *Agriculture*, 10(9), 367.
-

-
241. Prasad, K., Saradhi, P.P., Sharmila, P. (1999.): Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. Environ. Exp. Bot. 1999, 42, 1–10.
242. Prasad, R., Kumar, V., Prasad, K.S. (2014.). Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. African journal of Biotechnology, 13(6), 705-713.
243. Prasad, T.N.V.K.V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K.R., Sreepasad, T.S.P., Sajanalal, R., Pradeep, T. (2012.): Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. J Plant Nutr 35(6):905–927.
244. Preece, J.E., Sutter, E. (1991.): Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse. In: Micropropagation: Technology and application. Debergh, P.C.. Zimmerman, R.H (Editors), Kluwer Academic. Publishers., Dordrecht, The Netherlands. p. 71–91.
245. Pulit-Prociak, J., Banach, M. (2016.): Silver nanoparticles - a material of the future? Open Chem. 14, 76e91.
246. Quoirin, M., Lepoivre, P. (1977.): Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Hortic. 78, 437–442.
247. Rad, J.S., Karimi, J., Mohsenzadeh, S., Rad, M.S., Moradgholi, J. (2014.): Evaluating SiO₂ nanoparticles effects on developmental characteristic and photosynthetic pigment contents of *Zea mays* L., Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci., 2014, vol. 3, pp. 194–201.
248. Rafi, M.M., Epstein, E., Falk, R.H. (1997.): Silicon deprivation causes abnormalities in wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Plant Physiology 152:497–501.
249. Rajput, V.D., Minkina, T., Fedorenko, A., Chernikova, N., Hassan, T., Mandzhieva, S., Burachevskaya, M. (2021.): Effects of zinc oxide nanoparticles on physiological and anatomical indices in spring barley tissues. Nanomaterials, 11(7), 1722.
250. Raliya, R., Tarafdar, J.C. (2013.): ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in Clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). Agricultural Research, 2(1), 48-57.
251. Ramesh, M., Palanisamy, K., Babu, K., Sharma, N.K. (2014.): Effects of bulk & nano-titanium dioxide and zinc oxide on physio-morphological changes in *Triticum aestivum* Linn. J Glob Biosci 3:415–422.
-

-
252. Raskar, S.V., Laware, S.L. (2014.): Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3:467–473.
253. Raposo, M.F.D.J., Morais, A.M.M.B.D., Morais, R.M.S.C.D. (2015.): Carotenoids from marine microalgae: A valuable natural source for the prevention of chronic diseases. *Marine drugs*, 13(8), 5128-5155.
254. Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H.M., He, X., Mbarki, S., Brestic, M. (2017.): Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant, a critical review. *Front. Chem.* 5, 78.
255. Raven, J.A. (1986.): Biochemical disposal of excess H⁺ in growing plants? *New Phytol.* 104, 175-206.
256. Reezi, S., Babalar, M., Kalantari, M. (2009.): Silicon alleviates salt stress, decreases malondialdehyde content and affects petal color of salt stressed cut rose (*Rosa x hybrida* L.) ‘Hot Lady’. *African Journal of Biotechnology* 8(8):1502-1508.
257. Ren, F.C., Liu, T.C., Liu, H.Q., Hu, B.Y. (1993.): Influence of zinc on the growth, distribution of elements, and metabolism of one-year old American ginseng plants. *Journal of plant nutrition*, 16(2), 393-405.
258. Rengasamy, K.R., Kulkarni, M.G., Stirk, W.A., Van Staden, J. (2015.): Eckol improves growth, enzyme activities, and secondary metabolite content in maize (*Zea mays* cv. Border King). *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(2), 410-416.
259. Rico, C.M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. (2011.): Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J. Agric. Food Chem.* 59 (8), 3485e3498.
260. Rivero-Montejo, S.D.J., Vargas-Hernandez, M., Torres-Pacheco, I. (2021.): Nanoparticles as novel elicitors to improve bioactive compounds in plants. *Agriculture*, 11(2), 134.
261. Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J., Debergh, P. (2005.): Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82(1):57-66.
262. Ross, S. (2006.): Evaluación de sistemas avanzados de cultivo *in vitro* para propagación clonal de especies leñosas y semileñosas de interés productivo. MSc thesis, Montevideo, Uruguay, Facultad de Ciencias, Universidad de la República
263. Ross, S., Castillo, A. (2009.): Mass propagation of *Vaccinium corymbosum* in bioreactors. *Agrociencia* XIII (2) : 1–8.
-

-
264. Ross, S., Grasso, R. (2010.): *In vitro* propagation of 'Guayabo del país' (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret). *Fruit Veg Cereal Sci Biotech*, 4(special issue 1), 83-87.
265. Rovelli, P., Mettullo, R., Anthony, F., Anzueto, F., Lashermes, P., Graziosi, G. (2000.): Microsatellites in *Coffea arabica*. In: Sera, T., Soccol, C.R., Pandey, A., Roussos, S. (eds.) *Coffee biotechnology and quality*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 123–133.
266. Ruiz-Torres, N., Flores-Naveda, A., Barriga-Castro, E.D., Camposeco-Montejo, N., Ramírez-Barrón, S., Borrego-Escalante, F., García-López, J.I. (2021.): Zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate impact physiological parameters and boosts lipid peroxidation in soil grown coriander plants (*Coriandrum sativum*). *Molecules*, 26(7), 1998.
267. Ruttkay-Nedecky, B., Krystofova, O., Nejd, L., Adam, J. (2017.): Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. *NanoBiotechnology* 15:33.
268. Sabaghnia, N. Janmohammadi, M. (2015.): Effect of nano-silicon particles application on salinity tolerance in early growth of some lentil genotypes, *Ann. UMCS, Biol.*, 2015, vol. 69, pp. 39–55.
269. Saddique, Z., Naeem, I., Maimoona, A. (2010.): A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol* 131:511–521.
270. Sahebi, M., Hanafi, M.M., Siti Nor Akmar, A., Rafii, M.Y., Azizi, P., Tengoua, F., Nurul Mayzaitul Azwa, J., Shabanimofrad, M. (2015.): Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. *BioMed Res Int* 2015:16.
271. Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E., Olmos, E. (2004.): Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiol Plant* 120:152–161.
272. Sajc, L., Grubisic, D., Novakovic, G.V. (2000.): Bioreactors for plant engineering: An out for further research. *Biochem Eng J*, 4: 89–99.
273. Salama, Z.A., El-Fouly, M.M., Lazova, G., Popova, L.P. (2006.): Carboxylating enzymes and carbonic anhydrase functions were suppressed by zinc deficiency in maize and chickpea plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28(5), 445-451.
274. Salehi, H., Rad, A.C., Sharifan, H., Raza, A., Varshney, R.K. (2021.): Aerially Applied Zinc Oxide Nanoparticle Affects Reproductive Components and Seed Quality in Fully Grown Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Front Plant Sci.* 2022 Jan 12; 12: 808141.
-

-
275. Samadi, N., Yahyaabadi, S., Rezayatmand, Z. (2014.): Effect of TiO₂ and TiO₂ nanoparticle on germination, root and shoot length and photosynthetic pigments of *Mentha piperita*. *Int. J. Plant Soil Sci*, 3(4), 408-418.
276. Samarakoon, U.C., Weerasinghe, P.A., Weerakkody, A.P. (2006.): Effect of Electrical Conductivity [EC] of the Nutrient Solution on Nutrient Uptake, Growth and Yield of Leaf Lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Stationary Culture. *Trop Agric Res* 18: 13±21.
277. Sarkar, D., Naik, P.S. (2000.): Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures *in vitro*. *Plant Cell Tissue Org Cult* 60:139–149.
278. Savvas, D., Gizas, G., Karras, G., Lydakis-Simantiris, N., Salahas, G., Papadimitriou, M., Tsouka, N. (2007.): Interactions between silicon and NaCl-salinity in a soilless culture of roses in greenhouse. *European Journal of Horticultural Science* 72(2):73-79.
279. Savvas, D., Manos, G., Kotsiras, A., Souvaliotis, S. (2002.): Effects of silicon and nutrient-induced salinity on yield, flower quality, and nutrient uptake of gerbera grown in a closed hydroponic system. *Journal of Applied Botany* 76:153-158.
280. Savvides, A., Fanourakis, D., van Ieperen, W. (2012.): Co-ordination of hydraulic and stomatal conductances across light qualities in cucumber leaves. *Journal of experimental botany*, 63(3), 1135–1143.
281. Sayd, S.S., Taie, H.A., Taha, L.S. (2010.): Micropropagation, Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoids Content of *Gardenia jasminoides* Ellis as Affected by Growth Regulators. *International journal of academic research*, 2(3).
282. Schaller, J., Brackhage, C., Gessner, M.O., Bäuker, E., Gert Dudel, E. (2012.): Silicon supply modifies C: N: P stoichiometry and growth of *Phragmites australis*. *Plant Biology*, 14(2), 392-396.
283. Scherer, R.F., Garcia, A.C., de Freitas Fraga, H.P., Dal Vesco, L.L., Steinmacher, D. A., Guerra, M.P. (2013.): Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae* 151:38-45.
284. Schmidt, J. (2015.): Nanoparticle-induced membrane pore formation studied with lipid bilayer arrays. *Biophys. J.* 108, 344ae345a.
285. Schwab, F., Tanner, S., Schulin, R., Rotzetter, A., Stark, W., vonQuadt, A., (2015.): Dissolved cerium contributes to uptake of Ce in the presence of differently sized CeO₂-nanoparticles by three crop plants. *Metallomics* 7, 466e477.
-

-
286. Schwab, F., Zhai, G., Kern, M., Turner, A., Schnoor, J.L., Wiesner, M.R. (2016.): Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants - Critical review. *Nanotoxicology* 10 (3), 257e278.
287. Sedghi, M., Hadi, M., Toluie, S.G. (2013.): Effect of nano zinc oxide on the germination of soybean seeds under drought stress. *Ann West Uni Timis, oara ser Biol XVI* 2:73–78.
288. Shah, S.H., Houborg, R., McCabe, M.F. (2017.): Response of chlorophyll, carotenoid and SPAD- 502 measurement to salinity and nutrient stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*. 7:61.
289. Shah, V., Belozerova, I. (2009.): Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Pollut* 197:143–148.
290. Sharma, A., Patni, B., Shankhdhar, D., Shankhdhar, S.C. (2013.): Zinc—an indispensable micronutrient. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(1), 11-20.
291. Shaymurat, T., Gu, J., Xu, C., Yang, Z., Zhao, Q., Liu, Y., Liu, Y. (2012.): Phytotoxic and genotoxic effects of ZnO nanoparticles on garlic (*Allium sativum* L.): a morphological study. *Nanotoxicology*, 6(3), 241-248.
292. Shetty, R., Jensen, B., Shetty, N.P., Hansen, M., Hansen, C.W., Starkey, K.R., Jorgensen, H.J.L. (2012.): Silicon induced resistance against powdery mildew of roses caused by *Podosphaera pannosa*. *Plant Pathology* 61(1):102-131.
293. Shi, G.R., Cai, Q.S. (2009.): Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to zinc stress, *Biol. Plant.*, 2009, vol. 53, p. 391.
294. Sibbersen, E., Mott, K.A. (2010.): Stomatal responses to flooding of the intercellular air spaces suggest a vapor-phase signal between the mesophyll and the guard cells. *Plant Physiol.* 153, 1435–1442.
295. Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H. (2014.): Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* seeds Mill.). *Saudi Biol Sci* 21:13–17.
296. Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Faisal, M., Al Sahli, A.A. (2014.): Nano-silicon dioxide mitigates the adverse effects of salt stress on *Cucurbita pepo* L. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(11), 2429-2437.
297. Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Firoz, M., Al-Khaishany, M.Y. (2015.): Role of nanoparticles in plants. In *Nanotechnology and Plant Science. Nanoparticles and Their Impact on Plants*; Siddigui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Mohammad, F., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2015; pp. 9–35.
-

-
298. Signore, A., Serio, F., Santamaria, P. (2016.): A targeted management of the nutrient solution in a soilless tomato crop according to plant needs. *Front Plant Sci* 7: 391.
299. Singh, A., Singh, N.B., Hussain, I., Singh, H., Yadav, V., Singh, S.C. (2016.): Green synthesis of nano zinc oxide and evaluation of its impact on germination and metabolic activity of *Solanum lycopersicum*. *Journal of Biotechnology*, 233, 84-94.
300. Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965.): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158
301. Sivanesan, I., Park, S.W. (2014.): The role of silicon in plant tissue culture. *Front. Plant Sci.* 5:571.
302. Sivanesan, I., Song, J.Y., Hwang, S.J., Jeong, B.R. (2011.): Micropropagation of *Cotoneaster wilsoni* Nakai - a rare endemic ornamental plants. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 105, 55–63.
303. Slomberg, D.L., Schoenfisch, M.H. (2012.): Silica nanoparticle phytotoxicity to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental science & technology*, 46(18), 10247-10254.
304. Snir, I. (1983.): A micropropagation system for sour cherry. *Sci Hort* 19:85–90.
305. Soares, J.D.R., Pasqual, M., Araujo, A.G.D., Castro, E.M.D., Pereira, F.J., Braga, F.T. (2012.): Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 34, 413-421.
306. Soares, J.D.R., Pasqual, M., Rodrigues, F.A., Villa, F., de Araujo, A.G. (2011.): Silicon sources in the micropropagation of the *Cattleya* group orchid. *Acta Sci. Agron.* 33 503–507.
307. Sofy, M.R., Elhindi, K.M., Farouk, S., Alotaibi, M.A. (2020.): Zinc and paclobutrazol mediated regulation of growth, upregulating antioxidant aptitude and plant productivity of pea plants under salinity. *Plants*, 9(9), 1197.
308. Sonneveld, C., Voogt, W. (2009.): *Plant Nutrition of Greenhouse Crops*, Springer, ISBN 9048125316, New York, U.S.A.
309. Soundararajan, P., Manivannan, A, Cho, Y.S., Jeong, B.R. (2017.): Exogenous Supplementation of Silicon Improved the Recovery of Hyperhydric Shoots in *Dianthus caryophyllus* L. by Stabilizing the Physiology and Protein Expression. *Front. Plant Sci.* 8:738.
310. Soundararajan, P., Manivannan, A., Park, Y.G., Muneer, S., Jeong, B.R. (2015.): Silicon alleviates salt stress by modulating antioxidant enzyme activities in *Dianthus caryophyllus* ‘Tula’. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 56, 233–239.
-

-
311. Song, A., Xue, G., Cui, P., Fan, F., Liu, H., Yin, C., Liang, Y. (2016.): The role of silicon in enhancing resistance to bacterial blight of hydroponic and soil cultured rice. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13.
312. Soundararajan, P., Sivanesan, I., Jana, S., Jeong, B.R. (2014.): Influence of silicon supplementation on the growth and tolerance to high temperature in *Salvia splendens*. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 55, 271–279.
313. Soylemezoglu, G., Demir, K., Inal, A., Gunes, A. (2009.): Effect of silicon on antioxidant and stomatal response of two grapevine (*Vitis vinifera* L.) rootstocks grown in boron toxic, saline and boron toxic-saline soil. *Scientia horticultrae*, 123(2), 240-246.
314. Stamatakis, A., Papadantonakis, N., Lydakakis-Simantiris, N., Kefalas, P., Savvas, D. (2003.): Effects of silicon and salinity on fruit yield and quality of tomato grown hydroponically. In *Proceedings of the International Symposium on Managing Greenhouse Crops in Saline Environment*, Pardossi, A., G. Serra, and F. Tognoni (eds.). Book Series. *Acta Horticulturae* 609:141-147.
315. Stampoulis, D., Sinha, S.K., White, J.C. (2009.): Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9473e9479.
316. Stein, A.C., Viana, A.F., Muller, L.G., Nunes, J.M., Stolz, E.D., do Rego, J.C., Costentin, J., von Poser, G.L., Ratesa, S.M.K. (2012.): Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behav Brain Res* 228:66–73.
317. Suriyaprabha, R., Karunakaran, G., Yuvakkumar, R., Rajendran, V., Kannan, N. (2012.): Silica nanoparticles for increased silica availability in maize (*Zea mays* L) seeds under hydroponic conditions. *Curr Nanosci* 8:902–908.
318. Sun, X., Zhao, T., Gan, S., Ren, X., Fang, L., Karungo, S.K., Wang, Y., Chen, L., Li, S., Xin, H. (2016.): Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR 057. *Sci Rep* 6:24066.
319. Štajner, D., Popović, B.M., Čalić-Dragosavac, D., Malenčić, Đ., Zdravković-Korać, S. (2011.): Comparative study on *Allium schoenoprasum* cultivated plant and *Allium schoenoprasum* tissue culture organs antioxidant status. *Phytotherapy Research*, 25(11), 1618-1622.
-

-
320. Štolfa, I., Pfeiffer, T.Ž., Špoljarić, D., Teklić, T., Lončarić, Z. (2015.): Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Plants: Response of the Antioxidative System. In Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants under Stress; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 127–163. 54.
321. Taiz, L., Zeiger, E. (2010.): Photosynthesis: the light reactions. *Plant physiology*, 5, 163-198.
322. Takayama, S. Akita, M. (1994.): The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, (39): 147-156.
323. Takayama, S., Misawa, M. (1981.): Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlet by shake culture. *Plant Cell Physiol.*, 22: 461–467.
324. Tautorus, T.E., Dunstan, D.I. (1995.): Scale-up of embryogenic plant suspension cultures in bioreactors. In: Somatic embryogenesis in woody plants. Jain, M. Gupta, P.K and Newton, R.J. (Editors), Vol.1. Kluwer Academic. Publisher., Dordrecht, The Netherlands. p. 265–269.
325. Teixeira da Silva, J.A., Dobránszki, J., Ross, S. (2013.): Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(1), 1-16.
326. Teixeira da Silva, J.A., Chin, D.P., Van, P.T., Mii, M. (2011.): Transgenic orchids. *Sci Hortic* 130:673–680.
327. Teixeira da Silva, J.A., Giang, D.T., Tanaka, M. (2005a.) Effective acclimatization of *Epidendrum in vitro* using a novel micropropagation vessel. *Biotechnology* 4(3):214–220.
328. Teixeira da Silva, J.A., Giang, D.T., Tanaka, M. (2005b.): Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas*) in a novel CO₂-enriched vessel. *J Plant Biotech* 7(1):1–8.
329. Terwase L., P., Musa, L.M., Jamaledine, Z.O., Okere, U.A., Odofin, W.T., Aragon, C. (2012.): The Potential of Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) in Meeting Crop Production Demand in Nigeria. *Journal of Biology and Life Science* ISSN 2157-6076 2012, Vol. 3, No. 1
330. Thomas, P., Mythili, J.B., Stumman, B.M., Shivashankar, K.S. (2000.): Explant, medium and vessel aeration affect the incidence of hyperhydricity and recovery of normal plantlets in triploid watermelon. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(1), 19-25.
-

-
331. Tian, J., Cheng, Y., Kong, X., Liu, M., Jiang, F., Wu, Z. (2017.): Induction of reactive oxygen species and the potential role of NADPH oxidase in hyperhydricity of garlic plantlets *in vitro*. *Protoplasma* 254:379–388.
332. Tian, J., Jiang, F., Wu, Z. (2015.): The apoplastic oxidative burst as a key factor of hyperhydricity in garlic plantlet *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 120(2):571–584.
333. Triantaphylidès, C., Havaux, M. (2009.): Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in plant science*, 14(4), 219-228.
334. Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Chauhan, D.K., Dubey, N.K., Prasad, R. (2016.): Silicon as a beneficial element to combat the adverse effect of drought in agricultural crops. In: Ahmad P, editor. *Water stress and crop plants: A sustainable approach*. Chichester: Wiley Blackwell. pp. 682–694.
335. Tripathi, A., Liu, S., Singh, P.K., Kumar, N., Pandey, A.C., Tripathi, D.K., Chauhan, D.K., Sahi, S. (2017a.): Differential phytotoxic responses of silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticle (AgNps) in *Cucumis sativus* L. *Plant Gene* 11, 255e264.
336. Tripathi, D.K., Mishra, R.K., Singh, S., Singh, S., Vishwakarma, K., Sharma, S., Chauhan, D.K. (2017.): Nitric oxide ameliorates zinc oxide nanoparticles phytotoxicity in wheat seedlings: implication of the ascorbate–glutathione cycle. *Frontiers in plant science*, 8, 1.
337. Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Srivastava, P.K., Singh, V.P., Singh, S., Prasad, S.M., Singh, P.K., Dubey, N.K., Pandey, A.C., Chauhan, D.K. (2017b.): Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 167e177.
338. Vaculík, M., Lux, A., Luxová, M., Tanimoto, E., Lichtscheidl, I. (2009.): Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. *Environ Exp Bot* 67:52–58.
339. van den Dries, N., Gianni, S., Czerednik, A., Krens, F.A., de Klerk, G.J. (2013.): Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. *J Exp Bot* 64(16):5221–5230.
340. Vayssieres, L., Keis, K., Hagfeldt, A., Lindquist, S.E. (2001.): Three-dimensional array of highly oriented crystalline ZnO microtubes. *Chem Mater* 13:4395–4398.
341. Verma, S., Dubey, R.S. (2003.): Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164: 645-655.
-

-
342. Von Arnold (1982.): Factors influencing formation, development and rooting of adventitious shoots from embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Science Letters* 27 : 285-287.
343. Wang, P., Lombi, E., Zjao, F.J., Kopittke, P.M. (2016.): Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends Plant Sci* 21(8):699–712.
344. Wang, W.N., Tarafdar, J.C., Biswas, P. (2013.): Nanoparticle synthesis and delivery by an aerosol route for watermelon plant foliar uptake. *J. Nanopart. Res.* 15, 1417.
345. Webb, K.M., Garcia, E., Vera Cruz, C.M., Leach, J.E. (2010.): Influence of rice development on the function of bacterial blight resistance genes. *European journal of plant pathology*, 128(3), 399-407.
346. Welander, M., Persson, J., Asp, H., Zhu, L.H. (2014.): Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae* 179:227-232.
347. Wi, S.J., Su, J.J., Park, K.Y. (2010.): Inhibition of biphasic ethylene production enhances tolerance to abiotic stress by reducing the accumulation of reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum*. *Mol Cells* 30(1):37–49.
348. Winkelmann, K., San, M., Kyriotakis, Z., Skaltsa, H., Bosilij, B., Heilmann, J. (2003.): Antibacterial and cytotoxic activity of prenylated bicyclic acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum amblycalyx*. *Z Naturforsch C J Biosci* 58:527–532.
349. Wu, H.J., Yu, X.N., Teixeira da Silva, J.A., Shen, M.M. (2011.): Micropropagation of *Paeonia lactiflora* ‘Zhong Sheng Fen’ plantlets and rejuvenation of hyperhydric shoots. *N Z J Crop Hortic Sci* 39:271–278.
350. Xie, Y., Li, B., Zhang, Q., Zhang, C., Lu, K., Tao, G. (2011.): Effects of nano-TiO₂ on photosynthetic characteristics of *Indocalamus barbatus*. *J Northeast For Univ* 39:22–25.
351. Yng, J., Cao, W., Rui, Y. (2017.): Interactions between nanoparticles and plants, phytotoxicity and defense mechanisms. *J. Plant Interact.* 12, 158e169.
352. Yang, Y., Zhang, L., Huang, X., Zhou, Y., Quan, Q., Li, Y., Zhu, X. (2020.): Response of photosynthesis to different concentrations of heavy metals in *Davidia involucrata*. *PLoS One*, 15(3), e0228563.
353. Yeo, A.R., Flowers, S.A., Rao, G., Welfare, K., Senanayake, N., Flowers, T.J. (1999.): Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is
-

- accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow. *Plant Cell Environ.* 22, 559–565.
354. Youssef, M., El-Helw, M., Taghian, A., El-Aref, H. (2010.): Improvement of *Psidium guajava* L. using micropropagation. *Acta Horti* 849:223–230.
355. Zafar, H., Ali, A., Ali, J.S., Haq, I.U., Zia, M. (2016.): Effect of ZnO nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: growth dynamics and antioxidative response. *Frontiers in plant science*, 7, 535.
356. Zahir, A., Nadeem, M., Ahmad, W., Giglioli-Guivarc'h, N., Hano, C., Abbasi, B.H. (2019.): Chemogenic silvernanoparticles enhance lignans and neolignans in cell suspension cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2019, 136, 589–596.
357. Zaeem, A., Drouet, S., Anjum, S., Khurshid, R., Younas, M., Blondeau, J.P., Tungmunnithum, D., Giglioli-Guivarc'h, N., Hano, C., Abbasi, B.H. (2020.): Effects of Biogenic Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Oxidative Stress Response in Flax Seedlings vs. *In Vitro* Cultures: A Comparative Analysis. *Biomolecules.* 2020; 10(6):918.
358. Zargar, S.M., Agnihotri, A. (2013.): Impact of silicon on various agro-morphological and physiological parameters in maize and revealing its role in enhancing water stress tolerance. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 138-141.
359. Zhao, L., Peng, B., Hernandez-Viezcas, J.A., Rico, C., Sun, Y., Peralta-Videa, J.R., Tang, X., Niu, G., Jin, L., Ramirez, A.V., Zhang, J.Y., Gardea-Torresdey, J.L. (2012.): Stress response and tolerance of *Zea mays* to CeO₂ nanoparticles, cross talk among H₂O₂, heat shock protein and lipid peroxidation. *ACS Nano* 6, 9615e9622.
360. Zheng, L., Hong, F., Lu, S., Liu, C. (2005.): Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biol Trace Elem Res* 104(1):83–91.
361. Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J. (2004.): Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, 167(3), 527-533.
362. Ziv, M. (1991a.): Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* shoots. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds) *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 45–69.
363. Ziv, M. (1991b.): Quality of micropropagated plants – vitrification. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 27:64–69.

-
364. Ziv, M. (2000.): Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticultural Review*, (24): 1–30.
 365. Ziv, M. (2005.): Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, (81): 277-285.
 366. Ziv, M. (2010.): Silicon effects on growth acclimatization and stress tolerance of bioreactor cultured *Ornithogalum dubium* plants. *Acta Hort* 865:29–35.
 367. Ziv, M., Ronen, G. Raviv, M. (1998.): Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for large scale micropropagation of plants. *In vitro Cell Developmental Biology of Plant*. (34): 152-158.
 368. Zobayed, S., Armstrong, J., Armstrong, W. (2001.): Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. *Ann Bot* 87(1):53–59.
 369. Zuccarini, P. (2008.): Effects of silicon on photosynthesis, water relations and nutrient uptake of *Phaseolus vulgaris* under NaCl stress. *Biol. Plant*. 52, 157–160.
 370. Zuccherelli, G. (1979.): Moltiplicazione *in vitro* dei portainnesti clonali del pesco. *Frutticoltura* 41 : 15-20.
 371. (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

7. SAŽETAK

Imerzni sustav bioreaktora predstavlja potpuno kontrolirani modularni biotehnološki sustav koji koristi tekuću hranjivu podlogu, bez dodatka agara. Jedan od postojećih problema u ovakvim sustavima jest pojava vitrifikacije ili hiperhidriranosti. Vitrifikacija se u kulturi tkiva vizualno manifestira brojnim morfološkim poremećajima kao što su razvoj transparentnih listova, nabubrenih stabljika i deformiranih izdanaka, koji postaju lomljivi ili nekrotični. Doktorska disertacija temelji se na istraživanju optimizacije uzgojnih uvjeta u mikropropagaciji borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u TIB/TIS sustavu (SETIS™) s ciljem smanjenja štetne vitrifikacije primjenom nanočestica SiO₂ i ZnO te biljnog regulatora floroglucinola. Istraživanje je provedeno na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek tijekom 2020. i 2021. godine. Tekući medij sadržavao je mikro- i makro elemente WPM hranjive podloge (pH 5,0) uz dodatak 30 g/L šećera, 2 mg/L zeatina i 2 ml/L PPM-a. Istraživanje je uključivalo kontrolnu varijantu, četiri tretmana s primjenom različitih nanočestica (30 i 74 mg/L nano-SiO₂ te 1 i 10 mg/L nano-ZnO), dva tretmana biljnog regulatora (40 i 80 mg/L floroglucinol) te četiri tretmana kombinacije pojedinih nanočestica s floroglucinolom. Po završetku kultivacijskoga perioda (40 dana) utvrđen je značajni utjecaj tretmana na indeks vitrifikacije, anatomske značajke lista, morfološke pokazatelje rasta i razvoja, stabilnost hranjivog medija, bioakumulaciju elemenata mineralne ishrane te fiziološko-biokemijski odgovor biljaka borovnice. Indeks vitrifikacije kretao se od 10 do 40 %. Kontrolni tretman rezultirao je vitrifikacijom od 40 %. Analizom vitrificiranog biljnog materijala utvrđeno je veliko odstupanje od pravilnog rasporeda i građe staničja mezofila lista. Značajno veći broj puči zabilježen je kod tretmana s floroglucinolom, ali i kod tretmana njegove kombinacije s nano-SiO₂ i nano-ZnO. Tretmani nano-SiO₂ značajno su reducirali broj puči. Analizirani morfometrijski parametri i parametri produktivnosti nakon tretmana nano-SiO₂ te kombinacije s floroglucinolom nisu se značajno razlikovali u odnosu na kontrolni tretman. Nasuprot tome, tretmani nano-ZnO smanjili su vrijednosti morfometrijskih parametara te multiplikaciju, osim u slučaju tretmana floroglucinola s nano-ZnO gdje su utvrđeni značajno veći izdanci. Smanjenje koncentracija elemenata biljne ishrane pratilo je dinamiku usvajanja elemenata u biljnom tkivu eksplantata. Bioakumulacija Zn i Si u biljnom tkivu u odnosu na kontrolni tretman bila je u pozitivnoj korelaciji s vrijednostima nano-SiO₂ i nano-ZnO primijenjenim kroz zadane tretmane neovisno o koncentraciji. Primjena nano-SiO₂ kao i nižih koncentracija floroglucinola nije utjecala na

povećanje sadržaja ukupnog klorofila i karotenoida. Nasuprot tome, tretmani nano-ZnO i floroglucinolom, kao i tretmani kombinacije nano-SiO₂ i nano-ZnO s floroglucinolom, rezultirali su smanjenjem sadržaja ukupnog klorofila i karotenoida. Primjena nano-SiO₂ nije imala stresan učinak na pokazatelje fiziološko-biokemijskog odgovora kao što su sadržaj ukupnog klorofila i karotenoida, ukupnih fenola, sadržaj askorbinske kiseline i ukupne antioksidacijske aktivnosti. Također je kod navedenih tretmana utvrđena niska stopa vitrifikacije (20 %) te pravilne proporcije morfometrijskih parametara s parametrima produktivnosti u razini kontrole. Floroglucinol u nižoj koncentraciji od 40 mg/L također nije utjecao na promjenu sadržaja produkata lipidne peroksidacije. Sadržaj ukupnog klorofila i karotenoida, ukupnih fenola, antioksidativna aktivnost te sadržaj askorbinske kiseline bili su u razini kontrolnog tretmana, uz pozitivni učinak na pojedine morfometrijske parametre, produktivnost te indeks vitrifikacije. Rezultati istraživanja upućuju na potencijal primjene nano-čestica SiO₂, ali i biljnog regulatora floroglucinola, u supresiji vitrifikacije izdanka borovnice pri uzgojnim uvjetima TIB/TIS bioreaktora na tekućem hranjivom mediju. Usavršavanje protokola ukazuje na potrebu određivanja preciznijih koncentracija, ali i oblika Si, odnosno floroglucinola, kao model opsijskog reagensa u naknadnoj subkultivacijskoj fazi.

8. SUMMARY

Temporary Immersion Bioreactor System (TIB/TIS) is a fully controlled, modular biotechnical system that uses a liquid nutrient medium without agar addition. One of this system's existing problems, however, is the emergence of vitrification (hyperhydricity), which is visually manifested in the form of plants' morphological disorders, transparent leaf development, and swollen stems and shoots, which are deformed and become brittle. The dissertation is based on research of growing condition optimization in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) micropropagation by a TIB/TIS system (SETIS™), with the aim of reducing harmful vitrification while applying SiO₂ and ZnO nanoparticles and phloroglucinol as a plant growth regulator. The experiment was conducted at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek during the years 2020 and 2021. The liquid nutrient medium contained the micro- and macroelements of the WPM medium (pH 5.0), with the addition of 30 g/L of sugar, 2 mg/L of zeatin, and 2 ml/L of PPM. The experiment included a control variant, four treatments using different nanoparticles (30 and 74 mg/L of nano-SiO₂ and 1 and 10 mg/L of nano-ZnO, respectively), two plant growth regulator (40 and 80 mg/L of phloroglucinol) treatment, and four treatments using individual nanoparticle combinations with the plant growth regulator. At the end of the cultivation period (40 days), a significant effect of the treatment was determined on the vitrification index, leaf anatomy, morphological parameters, nutrient medium stability, mineral nutrition elements' bioaccumulation, and the blueberry plants' physiological-biochemical response. The vitrification index was within the range of 10 % to 40 %. The control treatment resulted in a forty-percent vitrification. By analyzing the vitrified plant material (40 %), a large deviation from a proper arrangement and structure of the leaf mesophyll cells was detected. Thus, a significantly larger stomata number was detected in the phloroglucinol treatment, as well as in the treatment of its combination with nano-SiO₂ and nano-ZnO. Nano-SiO₂ treatments significantly reduced the stomata number. By analyzing the morphometric and productivity parameters, nano-SiO₂ treatments, and a combination with phloroglucinol, the values of a control treatment were obtained. In contrast, the nano-ZnO treatments reduced the values of morphometric parameters and multiplication, except in the case of phloroglucinol treatment with nano-ZnO, which resulted in the significantly higher shoots. The decreasing concentrations of plant nutrition elements followed the element adoption dynamics within the explant plant tissue. In relation to the control treatment, the bioaccumulation of Zn and

Si in the plant tissue is positively correlated to the values of nano-SiO₂ and nano-ZnO, applied through the given treatments regardless of concentrations. The application of nano-SiO₂, as well as the lower phloroglucinol levels, did not affect an increase in the total chlorophyll and carotenoid content. In contrast, the treatments of nano-ZnO, phloroglucinol, and the combination of nano-SiO₂ and nano-ZnO with phloroglucinol resulted in a decrease in total chlorophyll and carotenoid content. A physiological-biochemical response to the application of nano-SiO₂ did not exert a stressful effect on the plants, and simultaneously the content of total chlorophyll and carotenoids, total phenols, and antioxidant activity and ascorbic acid did not change. Likewise, in the mentioned treatments, a low vitrification rate (20 %) and the correct morphometric and productivity proportions were established on the control level. Also, phloroglucinol, in a lower concentration of 40 mg/L, did not affect on the change of lipid peroxidation products content. The content of total chlorophyll and carotenoids, total phenols, antioxidant activity, and ascorbic acid are at the level of control treatment, with a positive effect exerted on certain morphometric parameters, productivity, and vitrification index. The research results indicate a potential of using SiO₂ nanoparticles, as well as the phloroglucinol plant regulator, in suppressing the blueberry shoots' vitrification in the TIB/TIS bioreactor under the growing conditions on a liquid nutrient medium. A protocol improvement imposes a necessity to determine the more precise concentrations and silicon forms and to determine phloroglucinol as an optional reagent model in a subsequent sub-cultivation phase.

ŽIVOTOPIS

Dejan Bošnjak, rođen 27. lipnja 1980. godine u Kneževu, općina Popovac (Baranja), Hrvat, državljanin Republike Hrvatske. Osnovnu školu završio tijekom progonstva u Osijeku gdje i upisuje srednju Poljoprivrednu školu općeg smjera koju završava 1998. godine. Preddiplomski studij Bilinogojstva na Poljoprivrednom fakultetu Osijek upisuje 2007. godine, a završava 2010. godine. Iste godine upisuje diplomski sveučilišni studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, smjer Voćarstvo kojeg završava u ožujku 2012. godine i stiče zvanje magistra inženjera agronomije, smjera voćarstvo. Pedagošku izobrazbu završava iste 2012. godine te se zapošljava u Poljoprivrednoj i veterinarskoj školi Osijek na mjesto profesora stručnih predmeta i voditelja poljoprivrednog školskog dobra do 2016. godine. Iste godine u svibnju 2016. godine prelazi na radno mjesto asistenta na Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo pri Zavodu za biljnu proizvodnju i biotehnologiju, Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, gdje osim znanstvenog rada sudjeluje u izvođenju nastave iz više modula na preddiplomskom i diplomskom sveučilišnom studiju. Poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti, smjer Agrokemija upisuje iste 2016. godine. Područje znanstveno istraživačkog rada usko je vezano za suvremenu voćarsku proizvodnju i rasadničarstvo. Tijekom rada na Fakultetu tri puta je boravio na stručnom usavršavanju putem Erasmus+ programa u Belgiji, Dept. Applied Biosciences - Faculty of Bioscience Engineering, Laboratory of Applied *In Vitro* Plant Biotechnology, University of Ghent. Suradnik je i voditelj na nekoliko projekata. Redovito sudjeluje na domaćim i međunarodnim simpozijima, kongresima i savjetovanjima, što je ujedno rezultiralo objavom većeg broja znanstvenih radova i sažetaka u domaćim i inozemnim časopisima koji se referiraju u međunarodnim publikacijama i bazama podataka. Kao autor i koautor objavilo je 4 rada u kategoriji a1 radova, 2 rada u kategoriji a2 radova, 5 radova u kategoriji a3 radova te 18 sažetaka i postera.