

Primjena efektivnih mikroorganizama u fazi rizogeneze i aklimatizacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) in vitro

Bižić, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:151:458880>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Tomislav Bižić

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**PRIMJENA EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA U FAZI
RIZOGENEZE I AKLIMATIZACIJE BOROVNICE (*Vaccinium
corymbosum* L.) *IN VITRO***

Diplomski rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Tomislav Bižić

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**PRIMJENA EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA U FAZI
RIZOGENEZE I AKLIMATIZACIJE BOROVNICE (*Vaccinium
corymbosum* L.) *IN VITRO***

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

Osijek, 2024.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Borovnica – <i>Vaccinium corymbosum</i> L.....	3
2.2. <i>In vitro</i> – faza rizogeneze/ukorjenjivanje.....	5
2.3. <i>In vitro</i> – faza aklimatizacije.....	6
2.4. Upotreba efektivnih mikroorganizama u kulturi biljnog tkiva.....	9
2.4.1. <i>Trichoderma spp.</i>	12
2.5. Perspektiva kultivacije borovnice <i>in vitro</i>	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija.....	15
3.2. Biljni materijal u istraživanju.....	15
3.3. Postavljanje pokusa i tretmani u istraživanju.....	17
3.4. Mjerenja u istraživanju.....	21
3.5. Statistička obrada podataka.....	22
4. REZULTATI	23
5. RASPRAVA	27
5.1. Razlike između primijenjenih tretmana EMO.....	27
5.2. Razlike između ispitivanih kultivara.....	29
6. ZAKLJUČAK	33
7. POPIS LITERATURE	35
8. SAŽETAK	43
9. SUMMARY	44
10. PRILOZI	45
11. POPIS TABLICA	51
12. POPIS SLIKA	52
13. POPIS GRAFIKONA	53
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Uzgoj borovnice u Hrvatskoj doživio je značajan porast u posljednje tri godine, potaknut sve većom potražnjom na domaćem i inozemnom tržištu. Ovaj trend prati globalne promjene u potrošačkim navikama, gdje se borovnica sve više prepoznaje kao "supervoće" zbog svojih nutritivnih i zdravstvenih prednosti. Hrvatska je zabilježila značajno povećanje površina pod nasadima borovnice, posebno u kontinentalnom dijelu zemlje, gdje su klimatski uvjeti pogodni za njen uzgoj. Područja poput Slavonije, Zagorja i Gorskog kotara postaju sve popularnija za uzgoj ove kulture. Uzgoj borovnice zahtijeva specifične uvjete, uključujući kisela tla i sustave za navodnjavanje. Proizvođači u Hrvatskoj podižu nasade s visokokvalitetnim kultivarima koji su traženi na tržištu, odnosno uzgajaju kultivare koje daju krupnije plodove i dulje sezonsko razdoblje berbe koje je ključno za povećanje konkurentnosti na tržištu. Hrvatska vlada i Europska unija kroz razne programe subvencija i potpore potiču nove ili buduće proizvođače borovnice.

Također posljednjih godina došlo je i do povećanja znanstveno-istraživačkog interesa vezanog za uzgoj borovnica, posebno u kontekstu otpornosti na klimatske promjene, poboljšanja kvalitete plodova i optimizacije tehnika uzgoja. Istraživačke institucije u Hrvatskoj provode studije koje se bave inovacijama u mikropropagaciji, tehnologijama uzgoja i nutritivnoj vrijednosti borovnica.

Efektivni mikroorganizmi (EMO) predstavljaju mješovite kulture korisnih mikroorganizama, a primarno se koriste u poljoprivredi i hortikulturi u razne svrhe, uključujući poboljšanje zdravlja tla i otpornosti biljaka. Njihova primjena u kulturi biljnog tkiva *in vitro* nije uobičajena niti široko istraжена. Razlog tome je specifična priroda *in vitro* tehnika koja zahtijeva strogo kontrolirane i aseptične uvjete gdje prisutnost mikroorganizama, uključujući i korisne može biti vrlo štetna.

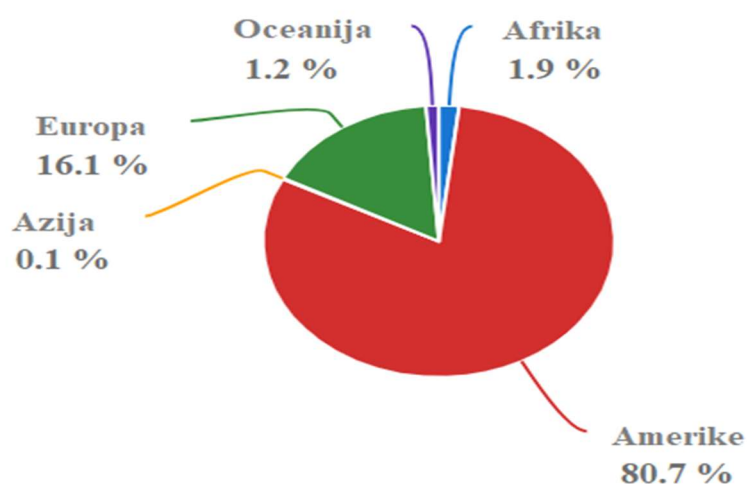
Cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje primjena EMO u fazi rizogeneze i aklimatizacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) iz *in vitro* u *ex vitro* uvjete. U posljednjoj fazi mikropropagacije, odnosno u fazi aklimatizacije na *ex vitro* uvjete EMO mogu imati značajnu ulogu. Prilikom premještanja biljaka iz sterilnog okruženja (*in vitro*) u tlo, EM mogu doprinjeti poboljšanju bioloških karakteristika supstrata, odnosno mikrobnom okruženju oko korijena, poboljšati razvoj korijena, povećati dostupnost i apsorpciju hranjivih tvari i zaštitu od patogena, itd.

U prvom dijelu diplomskog rada kroz pregled literature iznesene su novije spoznaje o globalnoj proizvodnji borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.), fazama razvoja korijena te prilagodbe biljke na *ex vitro* uvjete, kao i o primjeni efektivnih mikroorganizama u kulturi biljnog tkiva. Kroz poglavlje materijali i metode detaljno je opisan način provođenja istraživanja, primijene tretmana i mjerenja promatranih parametara. Analiza rezultata i rasprava omogućile su donošenje zaključka o uspješnosti pokusa, odnosno mogućnosti i utjecaju primjene efektivnih mikroorganizama u fazi rizogeneze i aklimatizacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Borovnica – *Vaccinium corymbosum* L.

Rod *Vaccinium* broji oko 450 vrsta. Među njima se najviše ističe američka borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) kao heterozigotna i poliploidna vrsta. Jedna je od vodećih *Vaccinium* vrsta koje su kultivirane u 20. stoljeću (Song, 2015.). Porijeklom je iz Sjeverne Amerike i istočne Azije. Iako se uzgaja malo više od 100 godina, po godišnjoj proizvodnji, od bobičastih kultura, samo jagode bilježe veće brojke (Zhang i sur., 2021.). Svjetska proizvodnja borovnica je u konstantnom porastu. Najveći proizvođači su zemlje američkih kontinenata kao što su: SAD, Kanada, Čile, Peru i Meksiko. One čine 80,7 % ukupne svjetske proizvodnje (Grafikon 1.).



Grafikon 1. Svjetska proizvodnja borovnice (1999. – 2022.)

(Izvor: FAOSTAT, 2024.)

Na Europu otpada samo 16,1 % proizvodnje kojoj najviše pridonose Španjolska, Francuska, Poljska i Njemačka. Kultivare možemo podijeliti u 2 grupe: „highbush“ ili visokogrmolike američke borovnice (zahtijevaju period 800 – 1000 sati hladnih vremenskih uvjeta) i „lowbush“ niskogrmolike (150 – 800 sati). Neki od značajnijih kultivara su: Bluecrop, Chandler, Bluegold, Liberty, Duke, Spartan, Aurora, Patriot, Toro, itd. (<https://www.tecnologiahorticola.com/variedades-arandanos/>). Vrijedi napomenuti da su svi navedeni kultivari američke borovnice (visokogrmoliki tip). Ova biljka ima široki spektar

primjene. Osim što se koristi u kulinarstvu (Song i Sink, 2006.), nalazi primjenu u medicini i ukrašavaju okoliša (Debnath i sur., 2020.). Lako se prepoznaje po malim, okruglim i mesnatim plodovima koji sadržavaju visoke razine antioksidativnih spojeva poput fenola, tanina i flavonoida. Također sadrže antocijane i karotenoide koji su zaslužni za boju ploda (Debnath i sur., 2020.). S nutricionističkog stajališta, borovnice su bogate vodom i šećerima, posebice glukozom i fruktozom, iako drugi šećeri poput galaktoze i ramnoze mogu biti prisutni, najčešće su u obliku šećernih komponenti povezanih s fenolnim spojevima (Schuchovski i Biasi, 2019.). Od istraživanog voća i povrća, borovnica je prepoznata kao jedan od najbogatijih izvora antioksidansa (Litwińczuk, 2013.). Razine antocijanina se kreću od 387 do 487 mg/100 g svježeg ploda (Kalt i sur., 2020.). Slijedom navedenog, dolazi do ekspanzije u tržištu borovnice te se bilježi povećana potražnja za američkom borovnicom i njenim kultivarima tijekom zadnjih nekoliko desetljeća (Cappai i sur., 2020.). Borovnica također ima utjecaj na regulaciju šećera u krvi, smanjenje oksidativnih procesa - stresa, ima protuupalno djelovanje te pomaže u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Kalt i sur., 2020.).

In vitro tehnika razmnožavanja je vrlo učinkovita za brzu i masovnu proizvodnju visoko kvalitetnog sadnog materijala i očuvanje genfonda *Vaccinium* vrsta (Ostrolucká i sur., 2007.). Borovnica se tradicionalno vegetativno razmnožava tehnikom iz reznica (Harutyunyan i sur., 2022.), ali zbog niskog postotka ukorjenjivanja ova metoda nije prikladna za sve kultivare. Stoga se ne smatra optimalnom za brzo razmnožavanje početnog materijala ili uvođenje novih kultivara u komercijalnu proizvodnju (Fan i sur., 2017.). Prednost ovog načina očituje se u dobivanju jednolikog sadnog materijala genetski identičnog matičnoj biljci (Mazurek i sur., 2023.). Pored toga, navedena metoda ima i određena ograničenja. Mazurek i sur., (2023.) iznose da su tradicionalne metode propagacije spore, zahtijevaju puno rada i ovisе o vremenskim uvjetima i godišnjem dobu. Utjecaj vanjskih vremenskih prilika (klima – mraz, tuča, izmrzavanja, poplave i dr.) može uvelike naštetiti cjelogodišnjoj proizvodnji sadnica i spriječiti proizvodnju. *In vitro* tehnikom stvaramo biljke koje imaju pojačan rast i grananje dok tradicionalno razmnožene jedinice stvaraju plodove s većim razinama antioksidativnih spojeva (Jamieson i Nickerson, 2003.; Mazurek i sur., 2023.). Miller i suradnici (2006.) su zaključili da je mikropropagacija najbolja metoda razmnožavanja borovnica s aspekta uspješnosti rizogeneze. Međutim, mikropropagacija zahtijeva značajno veću cijenu proizvodnje (Jamieson i Nickerson, 2003.). Uzimajući sve navedeno u obzir, izbor metode razmnožavanja će ovisiti o specifičnom cilju uzgoja i poželjnim karakteristikama voćke.

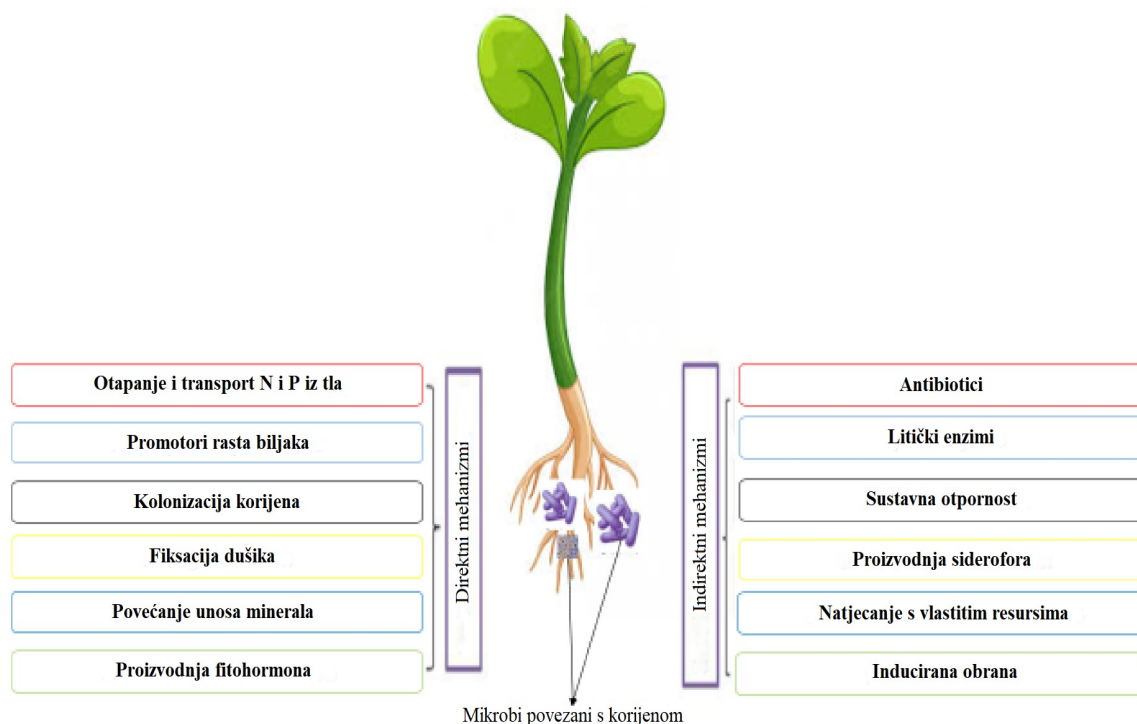
Mikropropagacija je jedna od najboljih metoda za brzo razmnožavanje biljaka (Litwińczuk, 2013.) i smatra se najučinkovitijom za masovnu produkciju novih klonova tijekom cijele godine (Mazurek i sur., 2023.). Pojedina istraživanja na mikropropagaciji borovnice iz aksilarnih izdanaka (Fan i sur., 2017.; Schuchovski i Biasi, 2019.; Cappai i sur., 2020.; Hernández i sur., 2024.) iznose da su biljke nastale ovom tehnikom (mikropropagacija) u usporedbi s tradicionalnom metodom (Shi i sur., 2017.) rezultirale boljom rizogenezom i većim prinosom. Kulturom tkiva, mikropropagacijom razmnožavanje biljaka odvija se u kontroliranim uvjetima kojim minimaliziramo rizik u prenošenju patogena, odnosno omogućujemo lakšu proizvodnju zdravog sadnog materijala (Litwińczuk, 2013.; Schuchovski i Biasi, 2019.; Cappai i sur., 2020.).

2.2. *In vitro* – faza rizogeneze/ukorjenjivanje

In vitro rizogeneza predstavlja jednu od ključnih faza mikropropagacije. U ovoj fazi koju odlikuju aseptični uvjeti i velika dostupnost hraniva dolazi do kontrolirane proliferacije biljnih stanica/tkiva koje je popraćeno indukcijom i formiranjem korijena u cilju lakše aklimatizacije i kasnijeg prenošenja u polje. Na proces ukorjenjivanja utječe nekoliko faktora: hranjivi medij, vrsta i koncentracije auksina, fiziološki status izdanaka te okolišni uvjeti poput vlage, temperature i svjetlosti (Jagiełło-Kubiec i sur., 2021.). Ludwig-Müller, 2000. iznosi da su najčešći korišteni auksini u *in vitro* poticanju i razvoju korijena: Indol-3-octena kiselina (IAA) i Indol-3-maslačna kiselina (IBA). Koncentracije auksina u hranjivom mediju potrebno je pažljivo prilagoditi kako bi postigli željeni učinak i izbjegli negativne utjecaje poput pretjerane formacije kaulsa ili deformacije korijena (Ludwig-Müller, 2000.). *Ex vitro* rizogeneza/ukorjenjivanje može se provesti bez uporabe auksina ili prethodnog uranjanja u otopinu IBA. Takav način rada smanjuje troškove, ali ovaj proces je često sporiji u odnosu na *in vitro* gdje je smanjen rizik od bolesti i utjecaja okolišnih stresora (Georgieva i Kondakova, 2021.).

Napredak u kulturi tkiva tijekom posljednjih godina ukazuje na razvoj novih pristupa s ciljem povećanja učinkovitost *in vitro* rizogeneze. Pojedina istraživanja govore o korištenju rizobakterija koje pospešuju razvoj korijena (Koyama i sur., 2019.; Che i sur., 2023.), primjenjuju se biostimulatori i poboljšivači rasta (Debnath, 2009.) te se manipulira mikrookolišem oko eksplantata kako bi se optimizirala indukcija i razvoj korijena (Che i sur., 2023.). Mikrobi koje su povezani s korijenom borovnice imaju ključnu ulogu u prilagodbi na kisela tla i ograničavanju unosa hraniva iz tla. Točnije, simbiotske reakcije s

mikoriznim gljivama olakšavaju unos hranjivih elemenata iz tla kao što je fosfor čiji je unos često ograničen u kiselim tlima (Che i sur., 2023.). Enagbonma i sur. (2023.) pronalaze da rizosferne bakterije također pridonose rastu biljaka i otpornosti na stresne uvjete kroz mehanizme kao što su fiksacija dušika, proizvodnja fitohormona i suzbijanje patogena koji se prenose tlom (Slika 1.).



Slika 1. Interakcija mikroba s korijenom

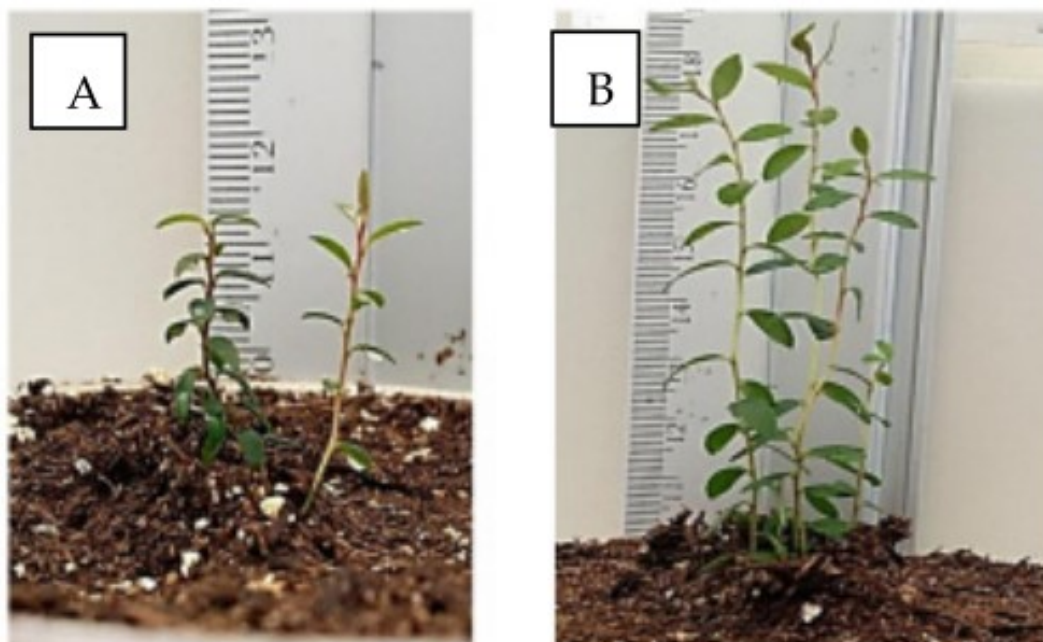
(prilagođeno po Enagbonma i sur., 2023.)

2.3. *In vitro* – faza aklimatizacije

Aklimatizacija predstavlja kritičnu fazu u mikropropagaciji kako borovnice, tako i drugih biljnih vrsta. Ona podrazumijeva prilagodbu biljaka nastalih u kontroliranom okolišu laboratorija (*in vitro*) na nekontrolirane uvjete polja ili staklenika (*ex vitro*). Tijekom ove faze, biljčice se postupno izlažu ambijentalnom svjetlu, vlazi, temperaturi i drugim čimbenicima koji će pomoći u adaptaciji i napretku u novoj okolini (Meneses i sur., 2022.). Pažljivo upravljanje i praćenje navedenih parametara nužni su za uspješnost i preživljavanje biljaka. Čimbenici kao što su učestalo zalijevanje, koncentracije hraniva i mjere suzbijanja patogena moraju se prilagoditi u cilju optimalnog rasta i razvoja biljaka (Meneses i sur.,

2022.; Wang i sur., 2023.). Također poželjno je osigurati odgovarajuću zasjenu i zaštitu od vremenskih nepogoda kako bi smanjili stres na biljni materijal (Litwińczuk i Wadas, 2008.; Meneses i sur., 2022.; Wang i sur., 2023.).

Meneses i sur., (2022.) iznose pozitivne učinke treseta na fazu aklimatizacije *V. floribundum* (Slika 2.), odnosno biljke koje su bile uzgajane na tresetnom supstratu rezultirale su najvećom stopom preživljavanja (100 %) dok su one uzgajane u „páramo“ crnici imale 70 % preživjelih jedinki.



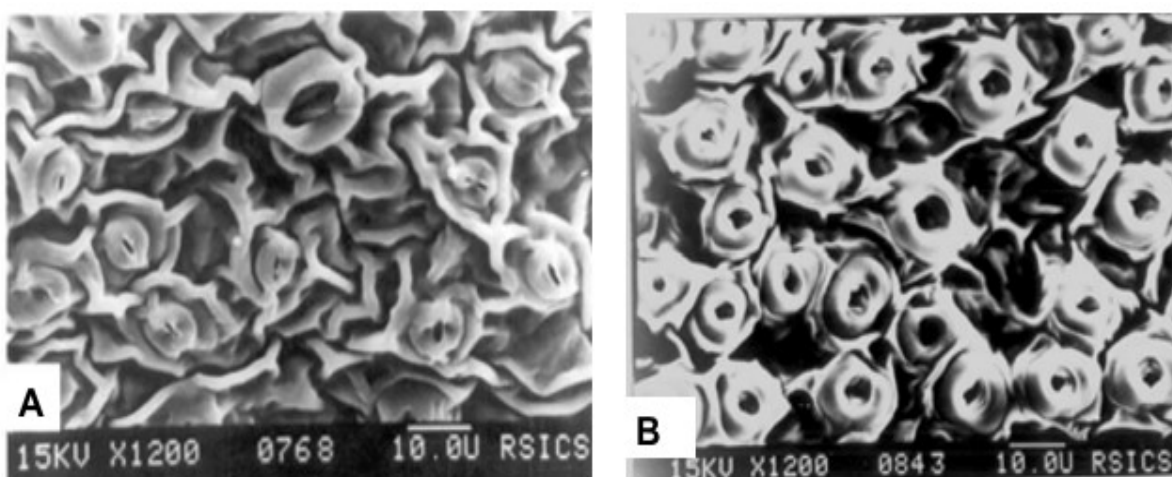
Slika 2. *V. floribundum* u *ex vitro* uvjetima nakon 1 dana (A) i 6 mjeseci (B)

(preuzeto iz Meneses i sur., 2022.)

Nadalje, Cobo i sur., (2018.); Meneses i sur., (2022.) iznose da su biljke u tresetnom supstratu imale dvostruko veći porast od onih u „páramo“ crnici. Fizikalna i kemijska svojstva treseta, poput fine strukture, male težine, poroznosti i neutralnog pH vjerojatno pridonose pravilnijem rastu i razvoju korijenovog sustava (Cobo i sur., 2018.; Georgieva i Kondakova, 2021.; Meneses i sur., 2022.). Wang i sur. (2023.) iznose pozitivne učinke „sphagnum“ mahovine u aklimatizaciji borovnice. Tretman u „sphagnum“ mahovini je imao najveći prosječni broj korjenčića te je značajno nadmašio ostale tretmane (treset, perlit, treset-perlit (2:1), „sphagnum“ mahovina-perlit (2:1), perlit-treset-vermikulit (3:3:1)). Tretman treset-perlit rezultirao je značajno većom prosječnom dužinom korijena, a tretman s tresetom značajno većom svježom i suhom masom korijena. Meneses i sur. (2022.) iznose kako unos hranjivih tvari može biti potencijalno ograničen kod *in vitro* biljaka koje imaju

nerazvijen korijenov sustav, a isti će rezultirati i sporijim rastom kultura. Slijedom navedenog, autori ističu važnost optimizacije protokola za razvoj korijena i predlažu dodavanje hranjivih tvari kako bi osnažili biljke i poboljšali njihova svojstva.

Mikropropagacija sadržava dvije potpuno različite faze: *in vitro* i *ex vitro*. U *in vitro* fazi, materijal koji se razmnožava nalazi se u zatvorenom sterilnom prostoru, na hranjivoj podlozi u točno određenim i strogo kontroliranim uvjetima. Nakon prijenosa iz ovih uvjeta započinje *ex vitro* faza. U takvom okruženju, biljke moraju prijeći s heterotrofne na autotrofnu ishranu koja je povezana sa strukturnom transformacijom organizma u novim uvjetima. Ovdje se biljke prilagođavaju na promjenjive čimbenike okoline. Prijelaz s laboratorijskih na poljske uvjete je u većini slučajeva kritičan i podrazumijeva odumiranje, odnosno smrt određenog postotka biljaka. Proučavanjem strukturnih osobina i razlika između biljaka u *in vitro* i *ex vitro* uvjetima možemo pridonijeti boljem razumijevanju situacije te minimiziranju gubitaka. Brainerd i sur. (1981.) proveli su istraživanje na anatomiji lišća i vodnom stresu kod biljaka uzgajanih u *in vitro* i *ex vitro* uvjetima. Autori iznose da biljke dobivene *in vitro* kulturom tri puta brže gube vodu u usporedbi s *ex vitro* biljkama iz staklenika. Debljina palisadnog parenhima također je bila puno manja kod *in vitro* biljaka nastalih u aseptičnim uvjetima za razliku od *ex vitro* biljaka iz staklenika ili polja. Struktura puči i njihovo neregularno funkcioniranje smatraju se čimbenicima koji pridonose prekomjernom gubitku vode kod biljaka (Hazarika i sur., 2006.). Istraživanja na SEM mikroskopu pokazala su da se struktura puči kod nekih vrsta kultiviranih biljaka značajno razlikuje od strukture biljaka koje se uzgajaju u staklenicima ili u polju (Slika 3.).



Slika 3. Elektronski mikrograf puči u listovima: biljke uzgojene u stakleniku *ex vitro* (A) i *in vitro* biljke (B), (preuzeto iz Hazarika, 2006.)

Biljkama iz laboratorija (*in vitro*) nedostaje vosak na listovima, a puči funkcioniraju djelomično ili uopće ne funkcioniraju (Grout, 1975.; Sutter i Langhans, 1979.). Narušen im je mehanizam otvaranja i zatvaranja. Slično pronalaze i drugi autori (Brainerd i Fuchigami, 1982.; Wardle i Short, 1983.; Lee i sur., 1988.). Na razvoj puči utječu i faktori poput koncentracije CO₂, vodnog režima i razine prisutnih hormona (Penfound, 1931.; Bünning i Sagromsky, 1947.; O'Leary i Knecht, 1981.). Puči biljaka u *in vitro* uvjetima obično su otvorene (Slika 3.) za razliku od puči u *ex vitro* uvjetima (Brainerd i Fuchigami, 1982.; Wetzstein i Sommer, 1982., 1983.).

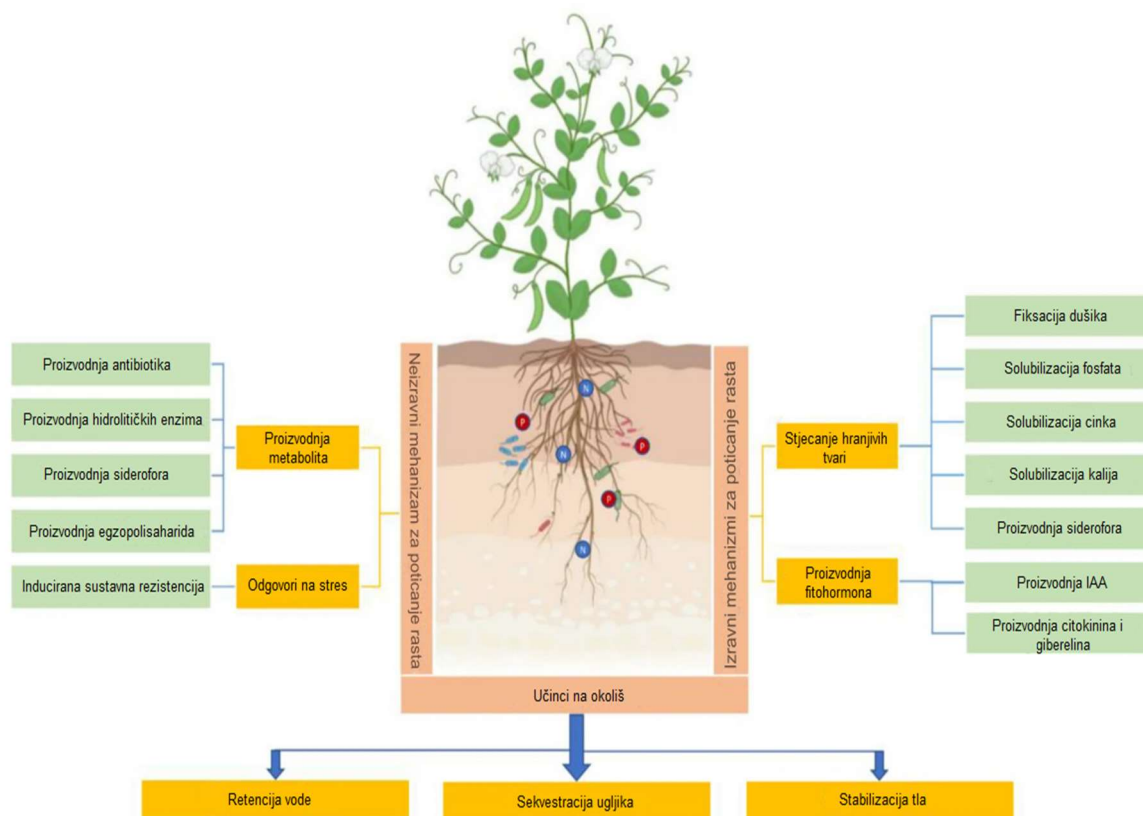
Kutas i Ogorodnyk (2015.) smatraju kako je to i očekivano uslijed kontroliranih uvjeta u kultivacijskim posudama u kojima je konstantno vrlo visoka vlaga (> 90 %), a kod temperature i intenziteta osvjetljenja nema radikalnih promjena. Dođe li do bilo kakve promjene stanja u posudi s kulturom, puči će reagirati kao odgovor na promjenu. Autori također navode da je uslijed prethodno iznesenog jasan neuspjeh znanstvenika koji pokušavaju u pokusima ometati rad puči koje reagiraju na uvjete u kojima se nalaze. Npr. uporaba antitranspiranata tijekom prijenosa biljaka iz *in vitro* u *ex vitro* uvjete narušila je rast biljaka što je rezultiralo smanjenjem stope fotosinteze (Danies i Kozlowski, 1974.). Prema istraživanjima Fabbrija i Suttera (1986.), građa lista šumske jagode formirane *in vitro* je okarakterizirana po relativno tankoj lisnoj plohi, nerazvijenim palisadnim parenhimom, velikim zračnim šupljinama u mezofilu te slabo razvijenoj kutikuli. S druge strane, list šumske jagode formiran u prirodnim uvjetima diferenciran je na palisadno i spužvasto tkivo s pravilno razvijenom kutikulom. Slične rezultate iznose Donnelly i Vidaver (1984.) proučavajući listove maline *in vitro*. Waldenmaier i Schmidt (1990.) primijetili su razlike u tkivima listova *in vitro* i *ex vitro* rododendrona. *In vitro* listovi su imali nedostatak porusa i slabo strukturiran mezofil. Prelaskom na *ex vitro* uvjete, njihova anatomska struktura se mijenja. Debljina im je porasla, broj slojeva epiderme i palisadnog tkiva se povećao te se pojavila kutikula. Aklimatizacija niskom stopom vlažnosti rezultirala je jasnom diferencijacijom tkiva u palisadni i spužvasti mezofil.

2.4. Upotreba efektivnih mikroorganizama u kulturi biljnog tkiva

Upotreba efektivnih mikroorganizama u biotehnologiji i kulturi tkiva postala je vrlo značajna uslijed mnogih prednosti koje ovi organizmi nude. Efektivni mikroorganizmi (*Effective microorganisms* – EMO) predstavljaju specifičnu mješavinu od približno 80 različitih

mikroorganizama koji pozitivno utječu na okoliš. Prirodnog su porijekla i nisu genetski modificirani, već su kultivirani zajedno na specifičan način koji omogućava njihov sinergični učinak (Ezeagu i sur, 2023.). Njihova je primjena u kulturi tkiva vrlo korisna. Poboľšana je regeneracija biljaka, povećava se otpornost na patogene i dolazi do optimizacije usvajanja hranjivih tvari (Higa i Parr, 1994.). Usprkos kontroverzama koje postoje oko znanstvenih tvrdnji o EMO tehnologiji, njena primjena u poljoprivredi je temeljito istražena (Ezeagu i sur, 2023.). Osim što nalazi primjenu u kompostiranju, poboljšanju strukture i produktivnosti tla, također se koristi i u druge svrhe kao što je recikliranje ostataka hrane. Primjena EMO se pokazala korisnom i u uzgoju životinja, gospodarenju okolišem te zdravlju i preventivnoj medicini (Ezeagu i sur, 2023.). Glavne komponente efektivnih mikroorganizama čine bakterije mliječne kiseline, fotosintetske bakterije, aktinomicete, kvasci i fermentacijske gljivice (Hidalgo i sur., 2022.). Bakterije mliječne kiseline (*Lactobacillus* spp.) su zaslužne za inhibiranje razvoja patogenih bakterija putem proizvodnje mliječne kiseline koja ima jaki antiseptički učinak (Golec i sur., 2007.). Fotosintetske bakterije (*Rhodospseudomonas* spp.) proizvode korisne tvari kao što su aminokiseline, nukleinske kiseline i vitamine koji pospešuju rast biljaka. Sintetiziraju korisne tvari nastale iz izlučevina korijena, organske tvari i štetne plinove koristeći sunčevu svjetlost i toplinu tla kao izvor energije (Ezeagu i sur, 2023.). Kvasci (*Saccharomyces* spp.) sintetiziraju antimikrobne i druge korisne supstance nastale od fotosintetskih bakterija, organskih tvari i korijena. Također se stvaraju hormoni i enzimi koji potiču diobu stanica. Nastali spojevi su korisni kao supstrat za bakterije mliječne kiseline i aktinomicete (Du i sur., 2020.). Fermentacijske gljive obuhvaćaju rodove *Aspergillus* i *Penicillium*. One razgrađuju organske tvari do alkohola, estera i antimikrobnih supstanci koje sprječavaju infekciju štetnim insektima (Talaat, 2019.). Aktinomicete su zaslužne za suzbijanje štetnih gljiva i bakterija. U uporabi je najčešće rod *Streptomyces*. Navedeni rod ističe se po produkciji sekundarnih metabolita koji imaju antibakterijsko, antigljivično, antivirusno i imunosupresivno djelovanje (Patzner i Braun, 2010.). Pored toga, oslobađaju enzime, fiksiraju dušik, otapaju fosfor te stimuliraju biljke u produkciji regulatora rasta kojim se poboljšava proizvodnja usjeva (Younas i sur., 2022.). Koristeći bakterije rizosfere, Pandey i sur. (2000.) iznose uspješnu *ex vitro* prilagodbu biljaka čajevca uzgojenih u *in vitro* kulturi. Bakterijski izolati *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas corrugata* 1 i *P. corrugata* 2 kao mikrobnii inokulanti brzo su kolonizirali tlo i pokazali pozitivni učinak na preživljavanje i rast biljaka, a posebice na duljinu izdanaka i broj listova čajevca. Trivedi i Pandey (2007.) također iznose da je inokulacija mikroizdanaka *Picrorhiza kurrooa* trima rizobakterijama koje potiču rast

biljaka (*Bacillus megaterium*, *B. subtilis* i *Pseudomonas corrugata*) bila vrlo učinkovita rezultirajući povećanom stopom preživljavanja biljaka nakon prijenosa u tlo. Bibi i suradnici (2023.) utvrđuju da određeni rodovi rizobakterija kao što su *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Azotobacter* pridonose razvoju biljaka kroz direktne i indirektne mehanizme djelovanja (Slika 4.).



Slika 4. Mehanizmi rizobakterija – poboljšanje rasta i razvoja (preuzeto i prilagođeno iz Bibi i sur., 2023.)

U svrhu poboljšanja aklimatizacije, osim bakterija, također se koriste i endofitne gljive. One uspostavljaju mutualističke simbiotske veze u supstratu u kojem se nalaze (Alam i sur., 2021.). Definirane su kao mikroorganizmi koji provedu cijeli ili većinu vlastitog životnog ciklusa kolonizirajući tkiva domaćina bez nanošenja štete (Galindo-Solís i Fernández, 2022.). Jedan rod gljiva koji se često koristi u navedene primjene jest *Trichoderma*. Sojevi gljiva iz ovog roda poznati su po svojim različitim benefitima kao što su prevencija zaraze patogenima (Sudha i sur., 2016.), stimulacija rasta stabljike i razvoj korijena, otpornost na bolesti, stvaranje sekundarnih metabolita koji inhibiraju određeni patogen ili druge endofitne gljive koje se natječu za prostor i nutrijente (Tseng i sur., 2020.; Tyśkiewicz i sur., 2022.). Istovremeno, poboljšava unos fosfora, nitrofikaciju i produkciju hormona poput auksina,

giberelina i indol-3-octene kiseline koji povećavaju otpornost na okolišni stres i reguliraju rast biljke (Firáková i sur., 2007.).

2.4.1. *Trichoderma spp.*

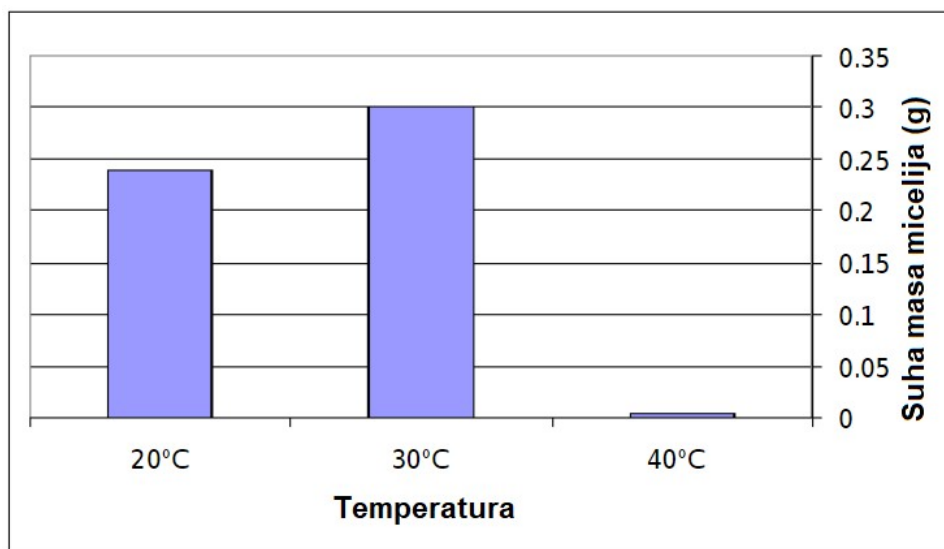
Trichoderma spp. je jedan od prevladavajućih rodova kultiviranih gljiva koje nalazimo u više vrsta tala. Sposobne su kolonizirati korijenje biljaka i biljne ostatke. Sojevi unutar navedenog roda su genetski raznoliki i pokazuju velik raspon učinaka (Harman i sur., 2004a). Rijetko uzrokuju bolesti na domaćinima (Gams i Bissett, 2002.), a sasvim suprotno koriste se za suzbijanje razvoja patogena. Imaju antagonističko djelovanje prema patogenima putem jednog ili više mehanizama: antagonizam, kompeticija i/ili parazitizam (Sofó i sur., 2010.). *Trichoderma* povećava dostupnost vlage u tlu (stvara povoljne uvjete za zdrav razvoj biljaka), što rezultira većom masom korijena kako u navodnjavanim tako i u suhim uvjetima (Pani i sur., 2021.).

Eliyanti i sur. (2023.) uspješno su aklimatizirali biljke banane koristeći supstrat u kojem su se nalazile različite koncentracije *Trichoderme* i arbuskularno mikoriznih gljiva . Kroz period aklimatizacije od 8 tjedana, zabilježena je 100 %-tna stopa preživljavanja biljaka. Upotreba *Trichoderme* i arbuskularne mikorize u različitim koncentracijama rezultirala je pozitivnim učinkom na aklimatizaciju. Utvrđeno je kako je kompost na bazi *Trichoderme* imao značajan utjecaj na visinu sadnice, duljinu i broj listova, dok na širinu lista i promjer „pseudostabljike“ nema utjecaja. Najbolji rast zabilježen je u tretmanu s omjerom 2:1 zemlje i komposta na bazi *Trichoderme*. Pojedina istraživanja ukazuju da je soj *Trichoderma harzianum* T-22 jedan od najefektivnijih te je sposoban kolonizirati korijenje većine biljnih vrsta u različitim vrstama supstrata (Harman i sur., 2004a). U istraživanju na biljkama kukuruza, nekoliko mjeseci nakon tretmana s *T. harzianum* T-22, korijen biljke bio je dvostruko veći u usporedbi s netretiranim kontrolnim biljkama (Harman i sur., 2004b). Gljive djeluju tako da se natječu za nutrijente s patogenima, ispuštaju hidrolitičke enzime te proizvode sekundarne metabolite koji su toksični za patogene u niskim koncentracijama (Mathivanan i sur., 2008.). *T. harzianum* proizvodi antimikrobne peptide koji se zovu peptaiboli, a djeluju na stanične membrane patogena inhibirajući njihov rast (Rebuffat i sur., 1995.). Morrell (1990.) otkriva da navedeni soj produkcijom takvih antibiotika inhibira razvoj truleži i ostale gljivične patogene do 60 %.

Trichoderma se često koristi u rasadnicima kao inokulant s ciljem poboljšanja faze ukorjenjivanja i aklimatizacije (Ellouze i sur., 2008.). U komercijalnoj proizvodnji, voćke se

također razmnožavaju i cijepljenjem, odnosno spajanjem podloge i plemke. Podloga diktira bujnost, produktivnost, otpornost na bolesti i štetnike te adaptibilnost na okoliš.

Mikropropagacija predstavlja suvremeni način razmnožavanja voćnih podloga kojima se osigurava produkcija određenih poželjnih svojstava. Problem u mikropropagaciji predstavljaju gubitci tijekom posljednje faze, faze aklimatizacije kada su biljke vrlo osjetljive na patogene. Radi bržeg razvoja korijena i nadzemnog dijela, supstrat se inokulira s *T. Harzianum* u količini od 1 kg/m³, 1 do 4 dana prije presađivanja podloge (Harman i sur., 2004a). Inokulacija se također može vršiti i u fazi ukorjenjivanja (rizogeneze), kada su biljke kultivirane u sterilnim *in vitro* uvjetima. Ovom metodom se može izbjeći konkurencija *T. Harzianum* s drugim mikroorganizama tla te bi se tako omogućila poboljšana interakcija s novonastalim korijenjem, a ista bi rezultirala i većim rastom biljaka (Sofa i sur., 2010.). Pored navedenog soja, u nekim pripravcima nalaze se i sojevi *Trichoderma koningii*. Kombinacijom navedenih sojeva, osigurava se djelovanje širokog spektra jer zajedno pokrivaju veći raspon temperatura (www.cedar-agro.hr/szb_ponuda/Proeco-katalog.pdf). El-Zahabi i Belal (2008.) u pokusu suzbijaju bijelu trulež koristeći *T. Harzianum*, te pronalaze da je optimalna temperatura za razvoj micelija navedene gljive 30 °C (Grafikon 2.). Pri većoj testiranoj temperaturi od 40 °C, micelij nije rastao.



Grafikon 2. Utjecaj temperature na razvoj *T. Harzianum*
(preuzeto i prilagođeno iz El-Zahabi i Belal 2008.)

Sankaranarayanan i sur. (1997.) koristeći *T. Harzianum* i *T. Koningii* ubijaju 100 % nematoda (*Meloidogyne incognita* i *M. javanica*) u tretiranim uzorcima unutar 24 sata, što ukazuje na efektivnost ovih mikroorganizama u suzbijanju biljnih patogena.

2.5. Perspektiva kultivacije borovnice *in vitro*

Mikropropagacija u kulturi biljnog tkiva pojavila se kao svestrana i nezamjenjiva tehnika za različite primjene u biljnoj biotehnologiji. Pored svoje svrhe u komercijalnom razmnožavanju biljaka, igra ključnu ulogu u istraživačkim područjima koja su usmjerena na genetsko unaprjeđenje, očuvanje genotipa, pošumljavanje i medicinske svrhe. Učinkoviti prijelaz s uzgoja u vanjskim uvjetima (*ex vitro*, *in situ*) na kulturu tkiva *in vitro* vrlo je važan u osiguranju visokokvalitetnog biljnog materijala. Napredak u tehnikama ili metodama mikropropagacije je neophodan s ciljem daljnje optimizacije novih protokola poput proliferacije i regeneracije tkiva i/ili eksplantata borovnice. Navedeno nam omogućuje krioprezervaciju, *in vitro* selekcije novih genotipova, hibridizaciju i genetičku transformaciju. Kultura tkiva služi i kao alat za očuvanje biološke raznolikosti, odnosno čuvanja genetskog resursa. Također, pomaže i u zaštiti endemskih i ugroženih vrsta od izumiranja. Ovaj sveobuhvatni pristup ne samo da olakšava razmnožavanje biljaka nego i podržava načela molekularnih, antifungalnih i kemijskih istraživanja što pridonosi napretku i održivosti uzgoja borovnice. Buduće perspektive u istraživanju na kulturi tkiva borovnice uključuju istraživanja somaklonskih varijacija. Ovaj koncept se odnosi na genetske varijacije koje se javljaju među biljkama dobivenim putem kulture tkiva, točnije iz nereproduktivnih (somatskih) stanica. Pojava može rezultirati biljkama borovnica s poželjnim osobinama, kao što je povećan prinos ili otpornost na bolesti, ali kontrastno može proizvesti i nepoželjne karakteristike (negativne mutacije). Pored toga, istraživanja koja su usmjerena na molekularne mehanizme i metabolite upućuju na otkrivanje biokemijskih procesa/puteva uključenih u rast i razvoj borovnice te odgovora na stres. Razjašnjavanjem ovih mehanizama, znanstvenici mogu identificirati ciljeve za genetsku manipulaciju i/ili poboljšanja uzgoja borovnice kroz povećanje kvalitete i otpornosti na okolišne čimbenike. Stalni napredak u istraživanjima na kulturi tkiva borovnice dodatno će unaprijediti razumijevanje o vrijednosti ove voćne vrste i pridonijeti njenom održivom uzgoju. Integriranjem tehnologije i automatizacijom u budućim istraživanjima mogla bi se potencijalno povećati produktivnost, te smanjiti trošak mikropropagacije borovnice pogotovo za proizvođače sadnog materijala koji bi imali velike koristi od ovih napredaka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija

Cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnosti poboljšanja rizogeneze i aklimatizacije *in vitro* izdanaka na tri kultivara visokogrmolike američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) Bluecrop, Legacy i Duke primjenom efektivnih mikroorganizama (EMO).

Pokus je postavljen u laboratoriju za voćarstvo na Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS). U laboratoriju se provode *in vitro* istraživanja na raznim voćnim vrstama kao što su lijeska, višnja, kupina, malina, orah, trešnja, razne vegetativne voćne podloge, aromatično, cvjetno i hortikulturno bilje. U laboratoriju se prvenstveno obavlja obrazovanje i edukacija studenata te znanstveno istraživački rad usko vezan za kulturu biljnog tkiva *in vitro*.

Od opreme, laboratorij je uistinu suvremeno opremljen, a raspolaže s dva autoklava, laminarima, magnetnim miješalicama, preciznim vagama, pH-metrima, skalpelima, pincetama, različitim oblicima tikvica, epruveta i posuđa za kulturu biljnog tkiva. Također posjeduje i kontrolirani suvremeni imerzni sustav bioreaktora SETIS™ (TIB/TIS), odnosno sustav koji koristi tekući hranjivi medij i komore za rast u kojima se reguliraju pojedini uvjeti svjetlost i temperature neophodni za uspješan rast i razvoj biljnih kultura *in vitro*.

3.2. Biljni materijal u istraživanju

U istraživanju su korištena tri aktualna kultivara američke visokogrmolike borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.): „Bluecrop“, „Legacy“ i „Duke“ uvedenih u *in vitro* kulturu prijašnjih godina.

Kultivar „**Bluecrop**“ predstavlja jednog od najrasprostranjenijih kultivara američke borovnice (Slika 5a.). Ima srednje kasno vrijeme dozrijevanja koje je obično u srpnju (Tablica 1.). Poznat je po svojoj velikoj produktivnosti i visokom prinosu. Plodovi kultivara Bluecrop srednje su veličine, okruglog oblika, tamnoplave boje, a odlikuje ih slatko-kiselkasti okus. (<https://njaes.rutgers.edu/fs419/> ; <https://minnetonkaorchards.com/bluecrop-blueberry/>)

Kultivar „Legacy“ ističe se svojim krupnim plodovima i visokim udjelom antioksidansa (Slika 5b.). Plodovi imaju izvrstan okus i visoke su nutritivne vrijednosti, što ga čine popularnim među potrošačima koji traže „zdrave“ proizvode. Plodovi kultivara Legacy su tamnoplave boje, ovalnog oblika, sočni i mesnati. (<https://www.oblueberry.com/variety/legacy/>)

Kultivar „Duke“ je raniji kultivar borovnice (Slika 5c. i Tablica 1.) poznat po svojoj adaptibilnosti na klimatske uvjete i brzom rastu. Plodovi su srednje veličine do krupni, tamnoplave boje, okruglog oblika te imaju slatkasti okus s trpkim notama. Ovaj kultivar je vrlo produktivan i može brzo postići punu zrelost plodova, što ga čini idealnim za uzgoj u hladnijim područjima ili na većim nadmorskim visinama. Ovaj kultivar pokazao je i dobru adaptaciju na različite tipove tla. (<https://www.shrubhub.com/Shop-Plants/Blueberry-Bushes/Duke-Blueberry/14719>)



Slika 5. Kultivari u istraživanju: a. Bluecrop, b. Legacy, c. Duke

(Izvor: <https://www.gardeners.com>, <https://ncblueberryjournal.blogspot.com> i

<https://www.gurneys.com>, Bižić, 2024.)

Svaki od ovih kultivara ima svoje jedinstvene karakteristike i prednosti, koje uzgajivači uzimaju u obzir prilikom odabira sorte za svoje nasade. Odabir sorte ovisi o željama

potrošača, lokalnim klimatskim uvjetima, agroekološkim faktorima te ciljevima proizvodnje.

Tablica 1. Dijagram dozrijevanja kultivara u istraživanju (Izvor: <https://njaes.rutgers.edu>)

Sorte	Svibanj			Lipanj			Srpanj			Kolovoz		
Duke												
Bluecrop												
Legacy												

3.3. Postavljanje pokusa i tretmani u istraživanju

U našem istraživanju korišten je gotovi Florimo supstrat za Rhododendrone (Slika 6.) s tresetom koji je sadržavao drvena vlakna, vapno, glinu te imao dodatak NPK hraniva.



Slika 6. Korišteni supstrat u istraživanju (Izvor: <https://www.flintstone.co.rs>)

Pri izboru supstrata bila je vrlo važna i niža pH vrijednost koja odgovara optimalnom uvjetu uzgoja borovnice:

- dušik $\text{NH}_4 + \text{NO}_3$ 130 mg/l (CaCl_2)
- fosfor P_2O_5 150 mg/l (CAL)
- kalij K_2O 170 mg/l (CAL)
- pH 5,4 (4,5 CaCl_2)

Tretman T1 (Tablica 2.) sadržavao je pet vrsta mikroorganizama: *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* i mikoriza s 9 simbiotskih spojeva endomikorize. Proizvođač ističe kako ovo sredstvo pridonosi biljkama tako što povećava iskoristivost hraniva iz tla, povećava vitalnost biljke, doprinosi boljem razvoju korijena, a mikroorganizmi se razmnožavaju u supstratu i na korijenu.

Tablica 2. Tretmani u istraživanju

<i>Tretman</i>	<i>Kultivar</i>	Koncentracija EMO (po L dH₂O)	Sastav EMO
<i>K</i> <i>(kontrola)</i>	Bluecrop	0	Bez EMO
	Legacy		
	Duke		
<i>T1</i>	Bluecrop	5 g	<i>Trichoderma</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i> , endomikoriza
	Legacy		
	Duke		
<i>T2</i>	Bluecrop	1 g	<i>Trichoderma koningii</i> <i>Trichoderma harzianum</i>
	Legacy		
	Duke		
<i>T3</i>	Bluecrop	0 + NAA	Bez EMO + NAA
	Legacy		
	Duke		
<i>T4</i>	Bluecrop	5 g + NAA	<i>Trichoderma</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i> , endomikoriza + NAA
	Legacy		
	Duke		
<i>T5</i>	Bluecrop	1 g + NAA	<i>Trichoderma koningii</i> <i>Trichoderma harzianum</i> + NAA
	Legacy		
	Duke		

Tretman T2 (Tablica 2.) također je klasificiran kao ojačivač bilja, a sastojao se od sojeva *Trichoderme koningii* (3×10^7 / g suhe tvari) i *Trichoderme harzianum* (2×10^7 /g suhe tvari). Kao što je u pregledu literature spomenuto *Trichoderma* vrste proizvode enzime i hormone koji pospješuju rast biljke. Povećavaju otpornost na bolesti i toleranciju na lošije uvjete tla. Gljive koje se razvijaju u području korijena istovremeno konkuriraju za hranu i prostor uzročnicima bolesti kao što su *Sclerotinia*, *Phyitium*, *Fusarium*, *Botrytis*, itd.

Istraživanje je uključivalo postavljanje 5 tretmana (T) s efektivnim mikroorganizmima (EMO) i jednog kontrolnog tretmana (K), dakle ukupno 6 tretmana (Tablica 2.). Svaki tretman postavljen je na sva 3 kultivara borovnice (Bluecrop, Legacy i Duke) s po 25 izdanaka po kultivaru (25 izdanaka x 3 kultivara = 75 izdanaka po tretmanu). Prva dva tretmana T1 i T2 uključivali su upotrebu EMO bez dodatka NAA, dok su tretmani T3, T4 i T5 uključivali upotrebu EMO i auksinskog fitostimulatora u prahu za oživljavanje zeljastih reznica koji je sadržavao amidni derivat čiste NAA (1-naftalenoctene kiseline).

Na kontrolnom tretmanu (K), EMO nisu korišteni. Sam proces vlaženja i aplikacije EMO započeo je prebacivanjem supstrata u posudu (Slika 7.) te vlaženjem istog s destiliranom vodom (dH_2O) u koju su bili aplicirani navedeni tretmani EMO (Tablica 2). Tretman T1 apliciran je u destiliranu vodu u koncentraciji od 5 g/L dH_2O , a tretman T2 u koncentraciji od 1 g/L dH_2O . Navedene koncentracije EMO bile su preporučene od strane proizvođača, odnosno dobavljača. Svi tretmani prethodno su pažljivo i precizno izvagani na laboratorijskoj vagi KERN KB 360-3N (Slika 8.).



Slika 7. Miješanje supstrata (Bižić, 2024)



Slika 8. Vaganje EMO (Bižić, 2024.)

Nakon što je supstrat adekvatno natopljen dH_2O s EMO, isti je prebačene u aklimatizacijske plastične posude (propagatore, mini-plastenike/staklenike). Supstrat se prilikom punjenja ravnomjerno raspoređuje kako ne bi imali rupa i neravnina u aklimatizacijskoj posudi. Također, prilikom punjenja uklanjaju se sve nečistoće iz supstrata kao što su preveliki drveni ostaci, kamenčići ili druge rezidue koje narušavaju strukturu supstrata. Po završetku punjenja

aklimatizacijske posude ista je podijeljena na 3 dijela pomoću drvenih ili aluminijskih štapića, a svaki dio je bio predodređen za jednog kultivara borovnice (Slika 11.).

Biljni materijal se vadi direktno iz *in vitro* posuda (staklenih teglica, Slika 9.) zajedno s kalusom te nježno ispiru pod vodom od ostatka gela. Škarama se kalus (baza) disecira od izdanaka (Slika 10.) te se odbacuje, a dobiveni izdanci su spremni za presađivanje u supstrat.



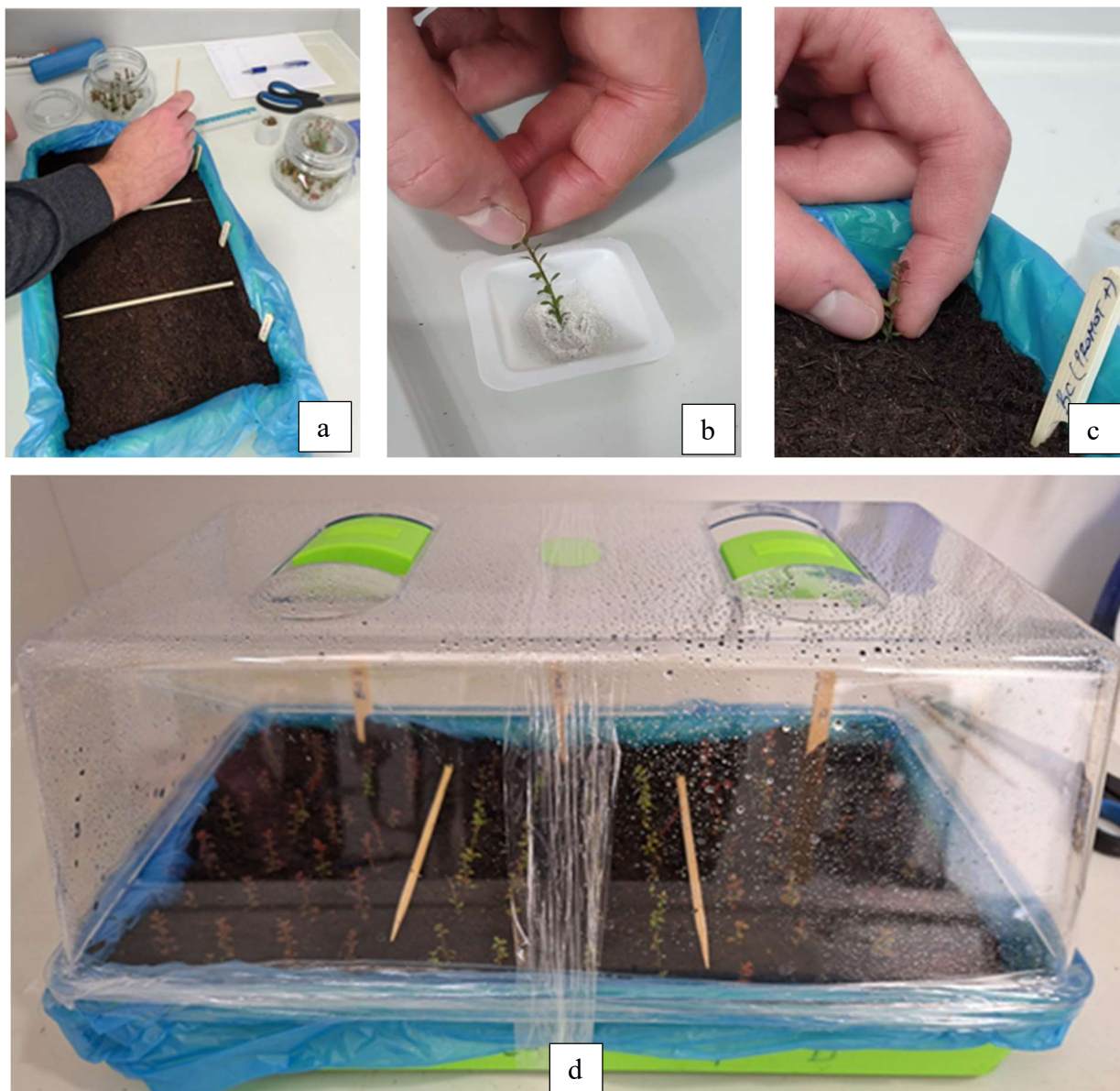
Slika 9. Biljni materijal *in vitro*
(Bižić, 2024.)



Slika 10. Disekcija kalusa i izdanaka
(Bižić, 2024.)

Slijedeći korak je izrada adekvatnih rupa u supstratu pomoću drvenih štapića (Slika 11a.) u koje se ulaže disecirani *in vitro* izdanak borovnice. Na tretmanima koji su uključivali aplikaciju auksina (T3, T4 i T5) u ovoj fazi baza izdanka bila je umočena u prah s NAA (1-naftalenoctene kiseline), a potom uložena u supstrat (Slika 11b.). Po postavljanju izdanka u pripremljenu rupu laganim pritiskom prstiju uspostavlja se potrebni kontakt supstrata s bazom izdanka (Slika 11c.).

Po završetku punjenja aklimatizacijskih posuda s izdancima, supstrat i izdanci dodatno su navlaženi s dH_2O pomoću ručnog mini raspršivača. Sve aklimatizacijske posude zatvorene su transparentnim poklopcem te sigurnosno omotane celofanskom folijom s ciljem prevencije i izolacije biljnog materijala od neželjenih vanjskih utjecaja i kontaminacije. Svi tretmani smješteni su u klima komoru pod kontrolirane uvjete, odnosno režim svjetlosti 16/8, intenzitet svjetlosti oko 3500 Lux-a i temperaturi $23\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.



Slika 11. Inicijacija izdanaka u aklimatizacijske posude: a. priprema rupa za izdanke, b. aplikacija tretmana s NAA, c. umetanje izdanka u sadno mjesto, d. konačni izgled tretmana (Bižić, 2024.)

3.4. Mjerenja u istraživanju

Nakon 30 dana kulture, pristupilo se pažljivom vađenju biljnog materijala iz supstrata i mjerenju sljedećih promatranih parametara:

Mjerenja su uključivala sljedeće parametre:

- Dužina izdanaka na početku aklimatizacije (cm)

- Dužina izdanaka na kraju aklimatizacije (cm)
- Stopa odumiranja izdanaka (broj neživih izdanaka na kraju pokusa)
- Broj pravih listova ($> 0,5$ cm)
- Broj korjenčića
- Dužina korjenčića (cm)

3.5. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podatci analizirani su pomoću Microsoft Office Excel 2013. i SAS Software 9.3. statističkog paketa. Od statističkih metoda korištena je ANOVA, a razlike između primijenjenih tretmana ispitane su Fisherovim LSD testom ($p \leq 0,05$).

4. REZULTATI

Prilikom postavljanja pokusa izmjerena je dužina svih izdanaka u istraživanju. Prema tablici 3. prosječna dužina izdanaka na kontrolnom tretmanu (K) po kultivaru kretala se u rasponu 2,45 cm (LGY), 2,46 cm (D) i 2,51 cm (BC), odnosno prosječno za sve kultivare u kontrolnom tretmanu 2,47. Na tretmanu T1 prosječne dužine su iznosile 2,14 cm (D), 2,79 cm (BC) i 3,12 cm (LGY), tj. prosjek tretmana iznosi 2,68 cm. Kod tretmana T2, kultivar Legacy bilježi najveću prosječnu dužinu izdanaka od 4,31 cm, prati ga Bluecrop s 3,58 cm po izdanku, a zadnji je Duke s izmjerenih 3,14 cm. Prosjek tretmana iznosi 3,68 cm. U tretmanu T3 najmanju prosječnu dužinu izdanaka ima Legacy (2,59 cm), zatim Duke (2,77 cm) i Bluecrop (3,06 cm). Prosjek cijelog tretmana je 2,81 cm. Kod tretmana T4 prosječne dužine izdanaka se kreću od 2,85 cm (BC), 2,86 cm (D) i 3,17 cm (LGY). Prosjek tretmana iznosi 2,96 cm. Tretman T5 bilježi prosječne dužine od 2,28 cm (LGY), 2,60 cm (D) i 2,88 cm (BC), dok prosjek svih kultivara u tretmanu je 2,59 cm. Konačno, prosječna dužina izdanaka cijelog pokusa bila je 2,86 cm (Tablica 3.).

Tablica 3. Prosječna dužina izdanaka po kultivaru, tretmanu i na razini pokusa

Kultivar	Tretman	Prosječna dužina izdanaka po kultivaru (0 dan)	Prosječna dužina izdanaka u tretmanu (0 dan)	Prosječna dužina izdanaka na razini cijelog pokusa (0 dan)
BC	K	2,51	2,47	2,86
LGY	K	2,45		
D	K	2,46		
BC	T1	2,79	2,68	
LGY	T1	3,12		
D	T1	2,14		
BC	T2	3,58	3,68	
LGY	T2	4,31		
D	T2	3,14		
BC	T3	3,06	2,81	
LGY	T3	2,59		
D	T3	2,77		
BC	T4	2,85	2,96	
LGY	T4	3,17		
D	T4	2,86		
BC	T5	2,88	2,59	
LGY	T5	2,28		
D	T5	2,60		

Nakon 30 dana kulture svi preživjeli izdanci su prebrojani te je utvrđena stopa preživljavanja izdanaka za svaki kultivar i tretman (Tablica 4.). Na kontrolnom tretmanu (K) stopa preživljavanja kretala se u rasponu od 16 % kod kultivara Legacy (LGY), 28 % na Bluecrop (BC) i 44 % Duke (D). Prosječna stopa živih izdanaka na kontrolnom tretmanu (K) iznosila je 29,3 %. Kod tretmana T1 stopa preživjelih izdanaka se kretala od 20 % (LGY), 28 % (BC) do 40 % (D). Prosječna stopa preživjelih izdanaka tretmana T1 iznosila je 29,3 %. Kod tretmana T2 najmanju stopu živih izdanaka bilježi kultivar Legacy (8 %). Više od dvostruko veće vrijednosti zabilježene su na kultivaru Bluecrop (20 %), dok je najuspješniji bio Duke s 68 % živih izdanaka. Prosjek tretmana T2 je 32 % preživjelih izdanaka borovnice. U tretmanu T3 stope preživjelih izdanaka su 8 % (LGY i D) i 12 % (BC). Prosjek tretmana T3 je 9,3 %. Kod tretmana T4 na kultivaru Legacy nije zabilježen niti jedan preživjeli izdanak (0 %), dok Bluecrop bilježi 16 %, a Duke 60 % živih izdanaka. Prosjek tretmana T4 iznosi 25,3 %. Tretman T5 bilježi iste rezultate glede kultivara Legacy s 0 % preživjelih jedinki, dok Bluecrop ima stopu od 4 %, a Duke 40 %. Prosječna stopa živih izdanaka ovog tretmana je 14,7 %. Na razini cijelog pokusa, stopa živih izdanaka iznosila je 23,3 % (Tablica 4.).

Tablica 4. Broj i stopa (%) preživjelih izdanaka u pokusu

Kultivar	Tretman	Broj živih izdanaka	Stopa (%) živih izdanaka	Prosječna stopa (%) živih po tretmanu	Prosječna stopa živih na razini pokusa (%)
BC	K	7	28	29,3	23,3
LGY	K	4	16		
D	K	11	44		
BC	T1	7	28	29,3	
LGY	T1	5	20		
D	T1	10	40		
BC	T2	5	20	32	
LGY	T2	2	8		
D	T2	17	68		
BC	T3	3	12	9,3	
LGY	T3	2	8		
D	T3	2	8		
BC	T4	4	16	25,3	
LGY	T4	0	0		
D	T4	15	60		
BC	T5	1	4	14,7	
LGY	T5	0	0		
D	T5	10	40		

Prema Tablici 5. na kontrolnom tretmanu (K) dužina izdanaka kretala se u rasponu od 3,48 cm na kultivaru LGY, kultivaru D 3,85 cm i 4,17 cm na kultivaru BC. Broj pravih listova kretao se u rasponu 2,14 (BC), 2,25 (LGY) do 3,73 (D). Broj korjenčića iznosio je prosječno 2 kod kultivara BC, 3 kod LGY i 2,45 kod D. Dužina korjenčića bila je najmanja kod kultivara LGY (1,07 cm), zatim BC (1,61 cm), a najveća kod kultivara D (2,39cm).

Tablica 5. Prosječna dužina izdanaka, broj pravih listova, broj i dužina korjenčića u istraživanju (*ND – *no data*, nema podataka)

Kultivar	Tretman	Dužina izdanaka (cm)	Broj pravih listova (> 0.5 cm)	Broj korjenčića	Dužina korjenčića (cm)
BC	K	4,17	2,14	2,00	1,61
LGY	K	3,48	2,25	3,00	1,07
D	K	3,85	3,73	2,45	2,39
BC	T1	3,30	0,57	1,43	1,00
LGY	T1	3,66	ND	1,60	0,74
D	T1	2,59	ND	1,80	1,49
BC	T2	5,00	0,60	1,00	1,74
LGY	T2	3,90	ND	1,00	1,25
D	T2	3,73	0,47	2,06	1,45
BC	T3	3,23	ND	1,33	1,28
LGY	T3	3,25	ND	1,00	0,55
D	T3	2,95	ND	1,00	0,85
BC	T4	3,33	0,75	2,00	0,85
LGY	T4	ND	ND	ND	ND
D	T4	2,97	0,40	2,33	1,22
BC	T5	3,00	ND	1,00	0,60
LGY	T5	ND	ND	ND	ND
D	T5	2,55	0,20	2,40	0,99

U tretmanu T1 (Tablica 5.) dužina izdanaka je iznosila 2,59 cm (D), 3,30 cm (BC) i 3,66 cm (LGY). Kod kultivara Legacy i Duke nisu zabilježeni pravi listovi dok kod Bluecrop-a broj listova iznosio je 0,57. Broj korjenčića se kretao u rasponu od 1,43 (BC), 1,60 (LGY) i 1,80 (D). Prema dužini korjenčića, najbolje rezultate bilježi Duke (1,49 cm), iza njega je Bluecrop (1), a posljednji je Legacy s prosječnom dužinom korjenčića od 0,74 cm. Kod tretmana T2 prosječna dužina izdanaka se kretala u rasponu od 3,73 cm (D), 3,90 cm (LGY) i 5 cm (BC). Kod kultivara Legacy nije zabilježen niti jedan novi pravi list dok kod kultivara Duke i Bluecrop broj listova iznosi 0,47, odnosno 0,60. Kultivari Bluecrop i Legacy bilježe po 1 korjenčić, dok Duke mjeri 2,06. Prema prosječnoj dužini korjenčića najboljim kultivarom se iskazao Bluecrop s 1,74 cm, zatim Duke s 1,45 cm te Legacy s 1,25 cm. U tretmanu T3

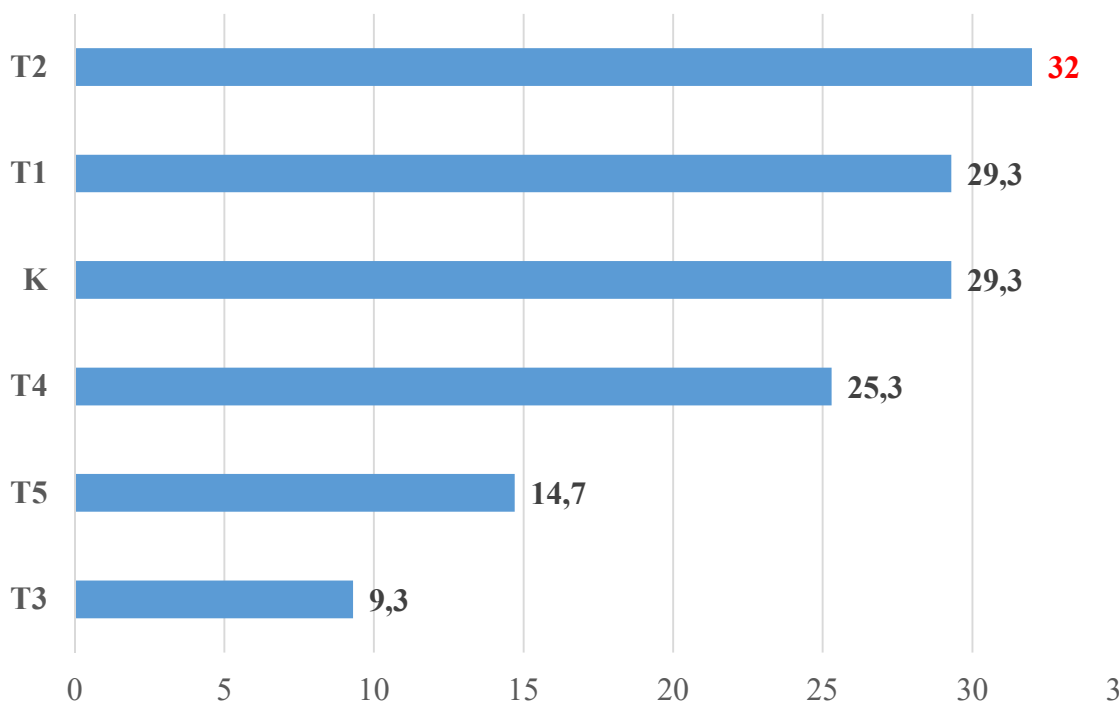
dužina izdanaka se kreće od 2,95 cm (D), 3,23 cm (BC) i 3,25 cm (LGY). Kod sva tri kultivara nije zabilježen nijedan pravi list. Broj korjenčića kod LGY i D prosječno je iznosio 1, dok kod kultivara BC iznosi 1,33. Prosječna dužina korjenčića se kretala od 0,55 cm (LGY), 0,85 cm (D) i 1,28 cm (BC). Kod tretmana T4 prosječne dužine izdanaka su 2,97 cm (D) i 3,33 cm (BC). Broj pravih listova kod kultivara Duke je 0,40, a kod Bluecrop-a je 0,75. Prosječni broj korjenčića iznosio je 2 (BC) i 2,33 (D). Prosječna dužina korjenčića je bila 0,85 cm (BC) i 1,22 cm (D). Na ovom tretmanu (T4) kultivar Legacy nije dao nikakve rezultate zbog sušenja i odumiranja svih izdanaka. Kod tretmana T5 prosječne dužine izdanaka su iznosile 2,55 cm (D) i 3 cm (BC). Pravi listovi su zabilježeni samo kod kultivara Duke s prosjekom od 0,2. Prosječan broj korjenčića je iznosio 1 (BC) i 2,40 (D). Prosječna dužina korjenčića je bila 0,60 cm (BC) i 0,99 cm (D). Uslijed potpunog sušenja kultivara Legacy u ovom tretmanu, nije zabilježen niti jedan od parametara (Tablica 5.).

5. RASPRAVA

5.1. Razlike između primijenjenih tretmana EMO

Nakon 30 dana aklimatizacije vizualno su uočena velika odstupanja u stupnju preživljavanja izdanaka između primjenjenih tretmana.

Prema grafikonu 3. najveća stopa preživljavanja na razini cijelog pokusa dobivena je na tretmanu T2 – 32 % (*Trichoderma koningii* i *Trichoderma harzianum*) koja je bila veća u odnosu na kontrolni tretman K (29,3). Tretman T1 (*Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, endomikoriza + NAA) rezultirao je preživljavanjem u rangu kontrolnog tretmana sa 29,3 %. Ostali tretmani (T3, T4 i T5) rezultirali su nižom stopom preživljavanja u odnosu na kontrolu (Grafikon 3.).



Grafikon 3. Razlike u stopi preživljavanja na razini pokusa između primijenjenih tretmana

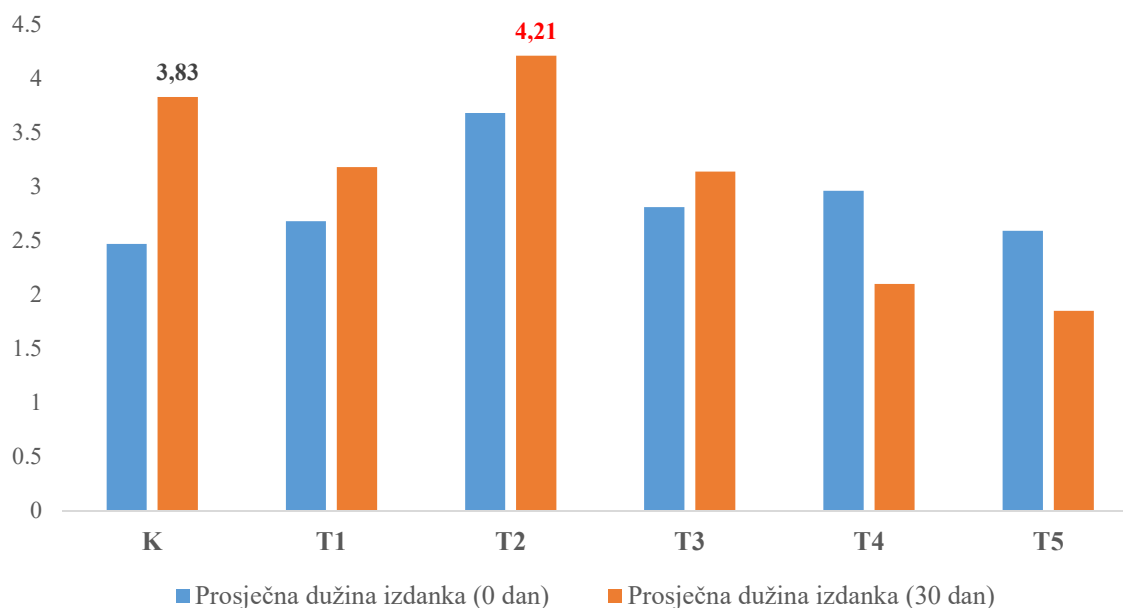
Analizom recentnih studija nismo utvrdili slična istraživanja utjecaja EMO na stopu preživljavanja biljaka *ex vitro*. Većinom se radi o utjecaju EMO na različite fiziološke parametre poput sadržaja klorofila, transpiracije i fotosintetske aktivnost (Ayan i sur., 2022.), ublažavanja solnog stresa, jačanja mikrobiološke populacije u tlu (Li i sur., 2024.), ali i suzbijanju patogena te poboljšanju kruženja hranjivih tvari, prinosa i kvalitete usjeva.

Na osnovu iznesenih rezultata možemo zaključiti da je tretman T2 s dva soja *Trichoderma* (*Trichoderma koningii* i *Trichoderma harzianum*) utjecao na poboljšanje, odnosno povećanu stopu preživaljavanja u odnosu na kontrolu.

Prema tablici 6. nisu utvrđene statističke razlike između kontrole (K) i primijenjenih tretmana EMO (T1, T2, T3, T4 i T5) u dužini izdanaka ($p = 0,1143$), broju korjenčića ($p = 0,3497$) i dužini korjenčića ($p = 0,0838$). Značajna razlika utvrđena je jedino za parametar broj pravih listova ($p < ,0001$) gdje je kontrolni tretman K razvio značajno veći broj pravih listova većih od 0,5 cm. Za pretpostaviti je da EMO nemaju utjecaj na razvoj listova jer nije uočena razlika u broju pravih listova između primijenjenih tretmana. Prema tablici 6. ali i grafikonu 4. tretman T2 rezultirao je najvećim izdancima ($4,21^A$) na kraju pokusa, također i dužina ($1,48^{AB}$) te broj korjenčića ($1,35$) bili su veći u odnosu na ostale tretmane (Tablica 6.). Andrzejak i Janowska (2022.) te Mahmoodian i sur., (2022.) iznose stimulatívne učinke *Trichoderma spp.* na formiranje listova i izduživanje stabljika i korijena kod ukrasnog bilja i biljkama graha. Dobiveni podaci u našem istraživanju sugeriraju na mogućnost utjecaja *Trichoderma spp.* na povećanje dužine izdanaka te broja i dužine korjenčića ali za potvrdu ove teze potrebno je obaviti dodatno istraživanje utjecaja drugih koncentracija primijenjenog tretmana s ovim sojevima *Trichoderma spp.*

Tablica 6. Statističke razlike između tretmana na razini cijelog pokusa za promatrane parametre dužina izdanaka, broj pravih listova, broj korjenčića i dužina korjenčića.

Tretman	Dužina izdanaka (cm)	Broj pravih listova (> 0,5 cm)	Broj korjenčića	Dužina korjenčića (cm)
K	3,83 ^{AB}	2,71 ^A	2,49	1,69 ^A
T1	3,18 ^{ABC}	0,19 ^B	1,61	1,08 ^{ABC}
T2	4,21 ^A	0,36 ^B	1,35	1,48 ^{AB}
T3	3,14 ^{ABC}	0,00 ^B	1,11	0,89 ^{ABC}
T4	2,10 ^{BC}	0,38 ^B	1,44	0,69 ^{BC}
T5	1,85 ^C	0,07 ^B	1,13	0,53 ^C
F - test	2,26	16,81	1,24	2,57
p	0,1143	<,0001	0,3497	0,0838

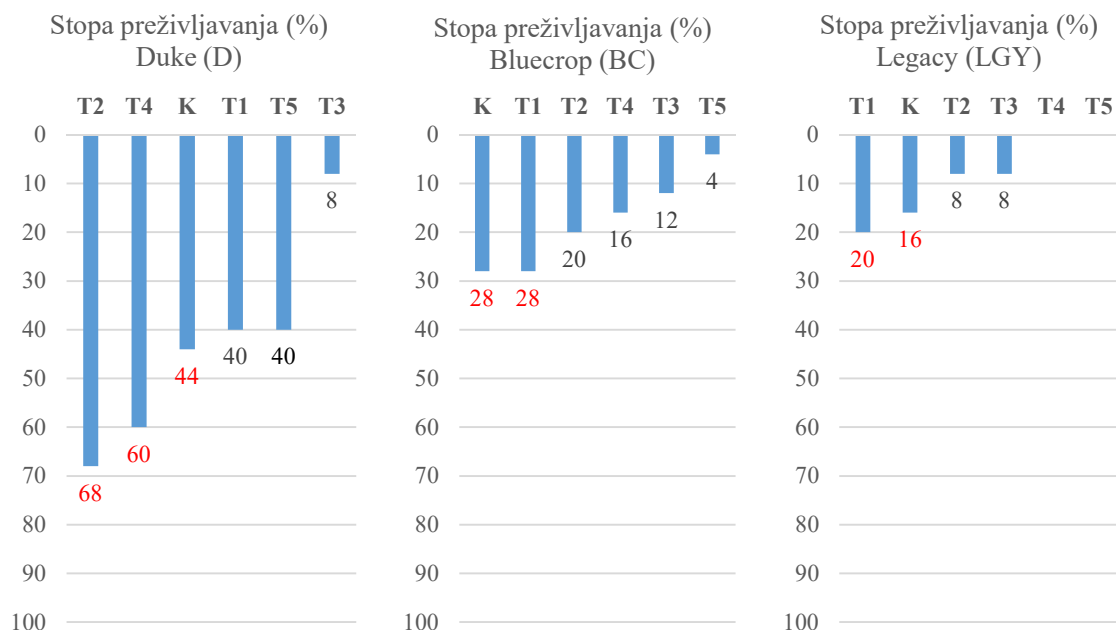


Grafikon 4. Razlike između tretmana u visini izdanaka na početku (0 dan) i na kraju ciklusa aklimatizacije (30 dan).

5.2. Razlike između ispitivanih kultivara

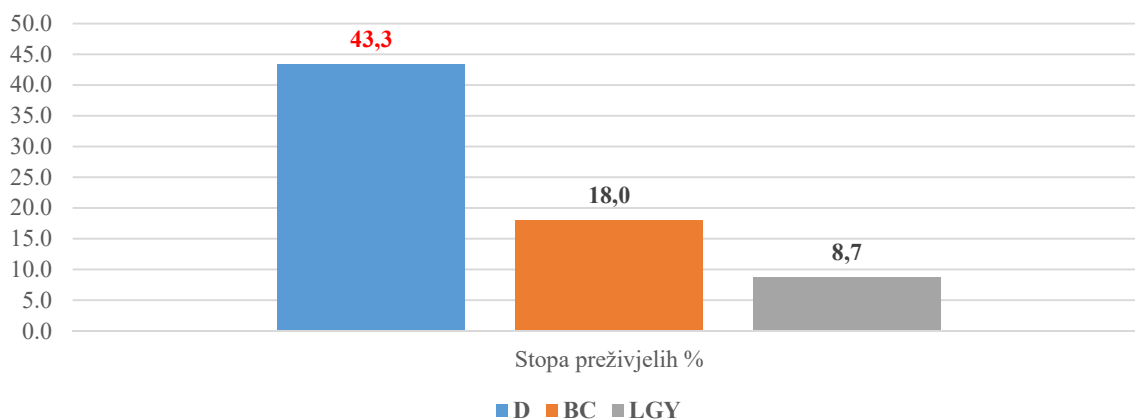
Najveća stopa preživljavanja na razini cijelog pokusa od 68 % zabilježena je kod kultivara Duke na tretmanu T2 koji je uključivao primjenu dva soja *Trichoderma koningii* i *Trichoderma harzianum* (Grafikon 5.). Na istom kultivaru tretman T4 s kombinacijom *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, endomikoriza + NAA rezultirao je sa 60 % preživjelih izdanaka. Na ostalim tretmanima kod ovog kultivara preživljavanje se kretalo u rasponu od 44 % - K, 40 % - T1 i T5 te najamnije na T3 od svega 8 %. Prema grafikonu 6. prosječna stopa preživjelih izdanaka bez obzira na tretmane bila je najveća na ovom kultivaru, a iznosila je 43,4 %.

Kultivar Bluecrop po pitanju preživljavanja izdanaka zauzima srednje drugo mjesto s vrijednostima u rasponu od 4 % (T5), 12 % (T3), 16 % (T4), 20 % (T2) i najvećih 28 % (K i T1). Dakle, niti jedan od primjenjenih tretmana nije bio učinkovitiji od kontrolnog tretmana na stopu preživljavanja. Jedino je tretman T1 s kombinacijom *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* i endomikoriza rezultirao identičnim postotkom preživljavanja kao i kontrolni tretman. Na razini cijelog pokusa bez obzira na primijenjene tretmane kultivar Bluecrop rezultirao je s 18 % preživjelih izdanaka (Grafikon 6.).



Grafikon 5. Stopa preživljavanja nakon 30 dana kulture po kultivarima (D, BC i LGY) i tretmanima (K, T1, T2, T3, T4, T5).

Najlošija stopa preživljavanja utvrđena je kod kultuvara Legacy, a ista se kretala u rasponu od 0 % (T4 i T5), 8 % (T2 i T3), 16 % (K) i 20 % (T1). Ovaj kultivar rezultirao je najmanjom stopom preživljavanja na razini cijelog pokusa od 8,7 % (Grafikon 6.). Iako je tretman T1 s kombinacijom *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* i endomikoriza rezultirao većom stopom preživjelih (20 %) u odnosu na kontrolu (16 %), ova razlika je bila vrlo mala te ne možemo tvrditi da je kombinacija ovih EMO u tretmanu utjecala na bolju stopu preživljavanja izdanaka (Grafikon 5.).



Grafikon 6. Stopa preživljavanja nakon 30 dana kulture po kultivarima na razini cijelog pokusa

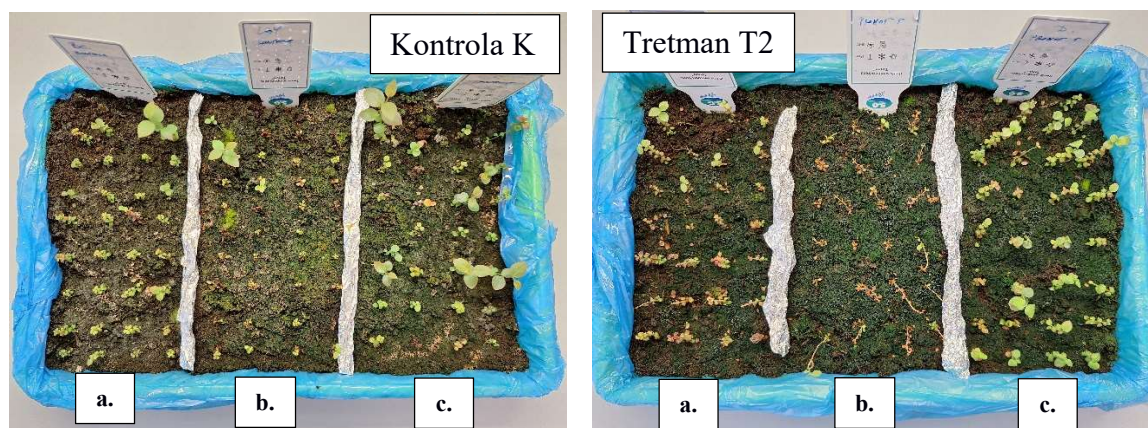
Na osnovu dobivenih rezultata stope preživjelih izdanaka kultivar Duke rezultirao je najvećom stopom živih u odnosu na ostala dva kultivara (Bluecrop i Legacy). Sukladno tome, možemo reći da je kultivar Duke najbolje podnio primijenjene tretmane EMO ali i ostale okolišne uvjete tijekom aklimatizacije (vlaga, svjetlost, supstrat, itd.). Tretman s primjenom dva soja *Trichoderma spp.* (T2 - *Trichoderma koningii* i *Trichoderma harzianum*) kod kultivara Duke pokazao se vrlo efikasnim kako na stopu preživljavanja izdanaka tako i na ostale promatrane parametre (Grafikon 5., Tablica 6., Slika 12. i 13.).

Prema dobivenim rezultatima stope preživljavanja na ostalim kultivarima (Bluecrop i Legacy) moguće je da su primijenjene koncentracije EMO koje su bile preporučene od strane proizvođača djelovale kontra efikasno, odnosno da su pojedini tretmani i njihove koncentracije djelovale toksično na biljni materijal u istraživanju jer se na tretmanima T3, T4 i T5 nakon 30 dana pojavilo posmeđenje i naglo odumiranje izdanaka, a posebice kod kultivara Legacy (kronologija je vidljiva na slikama u Prilozima).

Također, mogući je i negativni sinergijski toksični utjecaj primijenjene koncentracije NAA na tretmanima T3, T4 i T5 koji su sadržavali EMO, a što je također vidljivo posebice kod kultivara Legacy i Bluecrop. Naftil octena kiselina (NAA) je sintetski auksin koji se često koristi za poticanje rasta korijena i regulaciju rasta biljaka. Prema dostupnim istraživanjima, NAA obično ne djeluje toksično na sojeve *Trichoderme* kada se koristi u odgovarajućim koncentracijama. Na primjer, studije su pokazale da *Trichoderma spp.* može rasti i funkcionirati u prisutnosti auksina poput NAA, a da se pritom ne smanjuje njezina učinkovitost (Gamalero i Glick, 2015.). Međutim, učinak NAA na *Trichodermu* može varirati ovisno o koncentraciji i specifičnim vrstama *Trichoderme*. Visoke koncentracije NAA mogle bi imati inhibicijski učinak na rast i aktivnost *Trichoderme*, iako takvi slučajevi nisu dokumentirani. Standardne koncentracije NAA koje se koriste u poljoprivredi ne smatraju se toksičnima za *Trichodermu* (Vinale i sur., 2008).

Neka istraživanja su pokazala da *Trichoderma* ne samo da poboljšava solubilizaciju hranjivih tvari u tlu (Kashyap i sur., 2017), već također povećava površinu tla dostupnu biljci povećanjem duljine korijena i broja korijenovih dlačica koje apsorbiraju hranjive tvari (Zhang i sur., 2013). Rezultati u našem istraživanju djelomično potvrđuju ove navode. U našem istraživanju nije utvrđen značajan učinak *Trichoderma spp.* na povećanje duljine i broja korjenčića u tretmanu T2 ali su biljke na ovom tretmanu razvile duže izdanke te broj i dužinu korjenčića od svih ostalih primijenjenih tretmana (Tablica 6. i Slika 13.). Osim toga, mehanizam poticanja rasta koji se pripisuje *Trichodermi* smatra se da je povezan s

povećanjem proizvodnje biljnih hormona (indol-3-octena kiselina, citokinin, giberelini, zeatin, itd.), (Gravel i sur., 2007.; Zhang i sur., 2013.; López-Coria i sur., 2016.). Za detaljnije zaključke potrebno je obaviti daljnja istraživanja utjecaja nižih ili viših koncentracija primijenjenih EMO koji su sadržavali sojeve *Trichoderma spp.*.



Slika 12. Razlike između kontrolnog tretmana K i tretmana T2 po kultivarima: a. Bluecrop, b. Legacy i c. Duke (preživljavanje i izgled izdanaka) nakon 30 dana aklimatizacije (Bižić, 2024.)



Slika 13. Izgled korijena na izdanku kontrolnog tretmana K i tretmana T2 – kultivar Duke (Bižić, 2024.)

6. ZAKLJUČAK

Efektivni mikroorganizmi (EMO) predstavljaju mješovite kulture korisnih mikroorganizama, a njihova primjena u kulturi biljnog tkiva *in vitro* nije uobičajena niti široko istražena.

Na temelju dobivenih rezultata u ovom diplomskom radu možemo zaključiti sljedeće:

- Na kraju aklimatizacije (30 dana) vizualno su uočena velika odstupanja u stopi preživjelih izdanaka između primjenjenih tretmana ali i kultivara.
- Analizom recentnih istraživanja nisu utvrđena slična istraživanja utjecaja EMO na stopu preživljavanja biljaka *ex vitro*.
- Najveća stopa preživjelih izdanaka na razini cijelog pokusa dobivena je na tretmanu T2 – 32 % (*Trichoderma koningii* i *Trichoderma harzianum*) = veća u odnosu na kontrolni tretman K (29,3 %).
- Ostali tretmani u istraživanju rezultirali su nižom stopom preživjelih izdanaka u odnosu na kontrolu.
- Nisu utvrđene statističke razlike između kontrole i primijenjenih tretmanan EMO (u dužini izdanaka, broju korjenčića i dužini korjenčića).
- Značajna razlika utvrđena je jedino za parametar broj pravih listova gdje je kontrolni tretman razvio značajno veći broj pravih listova (većih od 0,5 cm).
- Za pretpostaviti je da EMO nemaju utjecaj na razvoj listova jer nije uočena razlika u broju pravih listova između primijenjenih tretmana.
- Nije utvrđen značajan učinak *Trichoderma spp.* na povećanje duljine i broja korjenčića u tretmanu T2 ali su biljke na ovom tretmanu razvile duže izdanke te broj i dužinu korjenčića od svih ostalih primijenjenih tretmana.
- Dobiveni podaci u našem istraživanju sugeriraju na mogućnost utjecaja *Trichoderma spp.* na povećanje dužine izdanaka te broj i dužinu korjenčića ali za potvrdu ove teze potrebno je obaviti dodatno istraživanje utjecaja drugih koncentracija primjenjenog tretmana s ovim sojevima *Trichoderma spp.*
- Najveća stopa preživljavanja na razini cijelog pokusa od 43,4 % zabilježena je kod kultivara Duke
- Kultivar Bluecrop rezultirao je vrlo loše sa svega 18 % preživjelih izdanaka, a kultivar Legacy s 8,7 %.

- Kultivar Duke najbolje je podnio primijenjene tretmane EMO ali i ostale okolišne uvjete tijekom aklimatizacije (vlaga, svjetlost, supstrat, itd.).
- Tretman s primjenom dva soja *Trichoderma spp.* (T2 - *Trichoderma koningii* i *Trichoderma harzianum*) kod kultivara Duke pokazao se vrlo efikasnim kako na stopu preživljavanja izdanaka tako i na ostale promatrane parametre.
- Prema dobivenim rezultatima, moguće je da su primijenjene koncentracije EMO s ili bez NAA preporučene od strane proizvođača, imale suprotan učinak na stope preživljavanja kod ostalih kultivara (Bluecrop i Legacy).
- Neki tretmani i njihove koncentracije vjerojatno su djelovali toksično na biljni materijal u istraživanju, jer su na tretmanima T3, T4 i T5 nakon 30 dana uočena posmeđenja i naglo odumiranje izdanaka, što je bilo posebno izraženo kod kultivara Legacy.
- Pretpostavljamo da postoji mogućnost i sinergijskog toksičnog učinka primijenjenih koncentracija NAA u tretmanima T3, T4 i T5, koji su sadržavali EMO, što je posebno vidljivo kod kultivara Legacy i Bluecrop.
- Visoke koncentracije NAA mogle bi imati inhibicijski učinak na rast i aktivnost *Trichoderme*, iako takvi slučajevi nisu dosad dokumentirani.
- Za detaljnije zaključke potrebno je obaviti daljnja istraživanja utjecaja nižih ili viših koncentracija primijenjenih EMO koji su sadržavali sojeve *Trichoderma spp.*

7. POPIS LITERATURE

1. Alam, B., Lǐ, J., Gě, Q., Khan, M. A., Gōng, J., Mehmood, S., Yuán, Y., Gǒng, W. (2021.): Endophytic fungi: From symbiosis to secondary metabolite communications or vice versa? *Frontiers Plant Science*, 12, 791033.
2. Andrzejak, R., Janowska, B. (2022.): *Trichoderma* spp. improves flowering, quality, and nutritional status of ornamental plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15662.
3. Ayan, S., Çalışkan, E., Özel, H.B., Çelik, E.N.Y., Yılmaz, E., Gülseven, O., Akın, Ş.S. (2022.): The influence of effective microorganisms on physiological characteristics of containerized taurus cedar (*Cedrus libani* A. Rich.) seedlings. *CERNE*, 28, e103018.
4. Bibi, A., Bibi, S., Al-Ghouti, M.A., Abu-Dieyeh, M.H. (2023.): Isolation and evaluation of Qatari soil rhizobacteria for antagonistic potential against phytopathogens and growth promotion in tomato plants. *Scientific Reports*, 13(1), 22050.
5. Brainerd, K.E., Fuchigami, L.H., Kwiatkowski, S., Clark C.S. (1981.): Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured "Pixy" plume prown under diferent enviroments. *Hort. Sci.* 16:173-175.
6. Brainerd, K.E., Fuchigami, L.H. (1982.): Stomatal functioning of in vitro and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, and CO₂. *Journal of experimental botany*, 33(3), 388-392.
7. Bünning, E., Sagromsky, H. (1947.): Die Bildung des Spaltöffnungsmusters in der Blattepidermis. *Naturwissenschaften*, 34, 191-192.
8. Cappai, F., Garcia, A., Cullen, R., Davis, M., Munoz, P.R. (2020.): Advancements in low-chill blueberry *Vaccinium corymbosum* L. tissue culture practices. *Plants*, 9(11), 1624.
9. Che, J., Wu, Y., Yang, H., Wang, S., Wu, W., Lyu, L., Wang, X., Li, W. (2023.): Root Niches of Blueberry Imprint Increasing Bacterial-Fungal Interkingdom Interactions along the Soil-Rhizosphere-Root Continuum. *Microbiology spectrum*, 11(3)
10. Cobo, M.M., Gutiérrez, B., Torres, M. (2018.): Regeneration of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) plants through axillary bud culture. *In vitro cellular & developmental biology-plant*, 54, 112-116.
11. Danies, W.J., Kozłowski, T. (1974.): Short and long-term effects antitranspirants on water relation and photosynthesis of woody plants. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 99:297-304.

12. Debnath, S.C. (2009.): A scale-up system for lowbush blueberry micropropagation using a bioreactor. *HortScience*, 44(7), 1962-1966.
13. Debnath, S.C., Goyali, J.C. (2020.): In Vitro Propagation and Variation of Antioxidant Properties in Micropropagated Vaccinium Berry Plants-A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(4), 788.
14. Donnelly, D.J., Vidaver, W.E. (1984.): Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109(2), 172-176.
15. Du, E., Oa, O., Ai, N. (2020.): Contributions of Effective Microorganisms and Organic Materials on Microbial Activities. *Agricultural Research & Technology Open Access Journal*, 25(2), 5562302.
16. Eliyanti, E., Zulkarnain, Z., Kartika, E., Ichwan, B. (2023.): The success of banana plantlets acclimatization by the application of Trichoderma-based compost and arbuscular mycorrhizae fungi in growing media. *Annals of Oradea University, Biology Fascicle/Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie*, 30(1).
17. Ellouze, W., Hanson, K., Nayyar, A., Perez, J. C., Hamel, C. (2008.): Intertwined existence: The life of plant symbiotic fungi in agricultural soils. U: Varma, A. (ur.) *Mycorrhiza - State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. 3rd. Edition. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany. 507–528.
18. El-Zahaby, H.M., Belal, E.B. (2008.): Biocontrol of cantaloupe white mould disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) (lib) de bary by *Trichoderma harzianum*. *J. Agric. Res., Kafrelsheikh Univ.* 34(2): 370 – 384.
19. Enagbonma, B.J., Fadiji, A.E., Ayangbenro, A.S., Babalola, O.O. (2023.): Communication between plants and rhizosphere microbiome: exploring the root microbiome for sustainable agriculture. *Microorganisms*, 11(8), 2003.
20. Ezeagu, G.G., Omotosho, A.O., Suleiman, K.O. (2023.): Effective microorganisms: a review of their products and uses. *Nile Journal of Engineering and Applied Science*, 1(1).
21. Fabbri, A., Sutter, E. (1986.): Anatomical changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. *Sci.Hort.* 28:331-337.
22. Fan, S., Jian, D., Wei, X., Chen, J., Beeson, R. C., Zhou, Z., Wang, X. (2017.): Micropropagation of blueberry ‘Bluejay’ and ‘Pink Lemonade’ through in vitro shoot culture. *Scientia horticultrae*, 226, 277-284.

23. Firáková, S., Šturdíková, M., Múčková, M. (2007.): Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biology*, 62(3), 251–257.
24. Gamalero, E., Glick, B.R. (2015.): Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiology*, 169(1), 13-22.
25. Galindo-Solís, J.M., Fernández, F.J. (2022.): Endophytic fungal terpenoids: Natural role and bioactivities. *Microorganisms*, 10(2), 339.
26. Gams, W., Bissett, J. (2002.): Morphology and identification of Trichoderma. U: Kubicek, P., Harman, E. (ur.) *Trichoderma and Gliocladium. Volume 1 –Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom. 3–34
27. Georgieva, M., Kondakova, V. (2021.): In vitro propagation of *Vaccinium corymbosum* L. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 27(2), 323-327.
28. Golec, A.F.C., Pérez, P.G., Lokare, C. (2007.): Effective microorganisms: myth or reality?. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 315-319.
29. Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J. (2007.): Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.*, 39: 1968-1977.
30. Grout, B.W. (1975.): Wax development on leaf surfaces of *Brassica oleracea* var. Currawong regenerated from meristem culture. *Plant Science Letters*, 5(6), 401-405.
31. Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004b): *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.
32. Harman, G.E., Lorito, M., Lynch, J.M. (2004a): Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. U: Laskin, A.I., Bennett, J.W., Gadd, G.M. (ur.) *Advances in Applied Microbiology. Volume 56*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA. 313–330.
33. Harutyunyan, Z.E., Vardanian, I.V., Hoveyan, Z.H., Avagyan, A.E., Hakobyan, A.H. (2022.): Biotechnology methods in study of *Vaccinium uliginosum* L. and *Vaccinium myrtillus* L. in Armenia. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science Volume 1045*
34. Hazarika, B.N. (2006.): Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. *Scientia horticultrae*, 108(2), 105-120.

35. Hazarika, B.N., Teixeira da Silva, J.A., Talukdar, A. (2006.): Effective acclimatization of in vitro cultured plants: methods, physiology and genetics. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*, 2, 427-438.
36. Hernández, R., López, A., Valenzuela, B., D'Afonseca, V., Gomez, A., Arencibia, A.D. (2024.): Organogenesis of plant tissues in colchicine allows selecting in field trial blueberry (*Vaccinium* spp. cv Duke) clones with commercial potential. *Horticulturae*, 10(3), 283.
37. Hidalgo, D., Corona, F., Martín-Marroquín, J.M. (2022.): Manure biostabilization by effective microorganisms as a way to improve its agronomic value. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(10), 4649-4664.
38. Higa, T., Parr, J.F. (1994.): Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment (Vol. 1, pp. 16-16). Atami, Japan: International Nature Farming Research Center.
39. Jagiełło-Kubiec, K., Nowakowska, K., Ilczuk, A., Łukaszewska, A.J. (2021.): Optimizing micropropagation conditions for a recalcitrant ninebark (*Physocarpus opulifolius* L. maxim.) cultivar. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57, 281-295.
40. Jamieson, A.R., Nickerson, N.L. (2003.): Field performance of the lowbush blueberry propagated by seed, stem cutting and micropropagation. *Acta Horticulturae*, 626, 423-428.
41. Kalt, W., Cassidy, A., Howard, L.R., Krikorian, R., Stull, A.J., Tremblay, F., Zamora-Ros, R. (2020.): Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.), 11(2), 224–236
42. Kashyap, P.L., Rai, P., Srivastava, A.K., Kumar, S. (2017.): Trichoderma for climate resilient agriculture. *World journal of microbiology & biotechnology*, 33(8), 155.
43. Koyama, R., Ribeiro Júnior, W.A., Zeffa, D.M., Faria, R.T., Saito, H.M., Gonçalves, L.S.A., Roberto, S.R. (2019.): Association of indolebutyric acid with *Azospirillum brasilense* in the rooting of herbaceous blueberry cuttings. *Horticulturae*, 5(4), 68.
44. Kutas, E., Ogorodnyk, L. (2015.): Acclimatization results of micro-propagated plantlets. *African Journal of Plant Science*, 9(3), 124-127.
45. Lee, N., Wetzstein, H.Y., Sommer, H.E. (1988.): Quantum Flux Density Effects on the Anatomy and Surface Morphology of in Vitro- and in Vivo-developed Sweetgum Leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113(1), 167-171.

46. Li, J., Wei, J., Shao, X., Yan, X., Liu, K. (2024.): Effective microorganisms input efficiently improves the vegetation and microbial community of degraded alpine grassland. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1330149.
47. Litwińczuk, W. (2013.): Micropropagation of *Vaccinium* sp. by in vitro axillary shoot proliferation. *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*, 63-76.
48. Litwińczuk, W., Wadas, M. (2008.): Auxin-dependent development and habituation of highbush blueberry (*Vaccinium* × *covilleianum* But. et Pl.) 'Herbert' in vitro shoot cultures. *Scientia Horticulturae*, 119(1), 41-48.
49. López-Coria, M., Hernández-Mendoza, J.L., Sánchez-Nieto, S. (2016.): *Trichoderma asperellum* induces maize seedling growth by activating the plasma membrane H⁺-ATPase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(10), 797-806.
50. Ludwig-Müller, J. (2000.): Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation*, 32, 219-230.
51. Mahmoodian, S., Motallebi, M., Zamani, M., Jahromi, Z.M. (2022.): Effect of improved *Trichoderma harzianum* on growth and resistance promotion in bean plant. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65, e22210671.
52. Mathivanan, N., Prabavathy, V.R., Vijayanandraj, V.R. (2008.): The effect of fungal secondary metabolites on bacterial and fungal pathogens. U: Karlovsky, P. (ur.) *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. Volume 14. *Soil Biology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany. 129–140
53. Mazurek, M., Siekierzyńska, A., Piechowiak, T., Spinardi, A., Litwińczuk, W. (2023.): Comprehensive Analysis of Highbush Blueberry Plants Propagated In Vitro and Conventionally. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 544.
54. Meneses, L.S., Morillo, L.E., Vásquez-Castillo, W. (2022.): In vitro propagation of *Vaccinium floribundum* Kunth from seeds: promissory technology for mortiño accelerated production. *Canadian Journal of Plant Science*, 102(1), 216-224.
55. Miller, S.A., Rawnsley, E.K., George, J., Patel, N. (2006.): A comparison of blueberry propagation techniques used in New Zealand. *Acta Hort.* 715, 397-402
56. Morrell, J.J. (1990.): Effects of volatile chemicals on the ability of microfungi to arrest basidiomycetous decay. *Material und Organismen*, 25, 267–274.
57. O'Leary, J.W., Knecht, G.N. (1981.): Elevated CO₂ concentration increases stomate numbers in *Phaseolus vulgaris* leaves. *Botanical Gazette*, 142(4), 438-441.

58. Ostrolucká, M.G., Gajdošová, A., Libiaková, G., Hrubíková, K., Bežo, M. (2007.): Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. U: Jain, S.M., Haggman, H. (ur.) Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, Dordrecht, 445-455.
59. Pandey, A., Palni, L.M.S., Bag, N. (2000.): Biological hardening of tissue culture raised tea plants through rhizosphere bacteria. *Biotechnology letters*, 22, 1087-1091.
60. Pani, S., Kumar, A., Sharma, A. (2021.): *Trichoderma harzianum*: An Overview. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, Vol. 10 (6) May 2021 : 32-39.
61. Patzer, S.I., Braun, V. (2010.): Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. *Journal of bacteriology*, 192(2), 426-435.
62. Penfound, W.T. (1931.): Plant anatomy as conditioned by light intensity and soil moisture. *American Journal of Botany*, 558-572.
63. Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B. (1995.): Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry*. 1849–1855.
64. Sankaranarayanan, C., Hussaini, S.S., Kumar, P.S., Prasad, R.D. (1997.): Nematicidal effect of fungal filtrates against root-knot nematodes. *Journal of Biological Control*, 37-41.
65. Schuchovski, C.S., Biasi, L.A. (2019.): In vitro establishment of 'Delite' rabbiteye blueberry microshoots. *Horticulturae*, 5(1), 24.
66. Shi, X., Yang, L., Yan, G., Du, G. (2017.): Medium pH between 5.5 and 7.5 has minimal effects on tissue culture of apple. *HortScience*, 52(3), 475-478.
67. Sofo, A., Milella, L., Tataranni, G. (2010.): Effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on the growth of two *Prunus* rootstocks during the rooting phase. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(6), 497-502.
68. Song, G.Q. (2015.): Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Agrobacterium Protocols: Volume 2*, 121-131.
69. Song, G.Q., Sink, K.C. (2006.): Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). U: Wang, K. (ur.) *Agrobacterium Protocols Volume 2. Methods in Molecular Biology*, Volume 344. Humana Press.

70. Sudha, V., Govindaraj, R., Baskar, K., Al-Dhabi, N., Duraipandiyan, V. (2016.): Biological properties of endophytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59(1), 1–7.
71. Sutter, E., Langhans, R.W. (1979.): Epicuticular wax formation on coronation plantlets regenerated from shoot-tip culture. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 104:493-496.
72. Talaat, N. B. (2019.): Effective microorganisms: An innovative tool for inducing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) salt-tolerance by regulating photosynthetic rate and endogenous phytohormones production. *Scientia Horticulturae*, 250, 254-265.
73. Trivedi, P., Pandey, A. (2007.): Biological hardening of micropropagated *Picrorhiza kurrooa* Royel ex Benth., an endangered species of medical importance. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 877-878.
74. Tseng, Y.H., Rouina, H., Groten, K., Rajani, P., Furch, A.C.U., Reichelt, M., Baldwin, I.T., Nataraja, K.N., Uma Shaanker, R., Oelmüller, R. (2020.): An endophytic *Trichoderma* strain promotes growth of its hosts and defends against pathogen attack. *Frontiers in Plants Science*, 11, 573670.
75. Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Jaroszuk-Ściseł, J. (2022.): *Trichoderma*: The current state of its application in agriculture for the biological control of fungal phytopathogens and the stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Science*, 23(4), 2329.
76. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. (2008.): *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
77. Waldenmaier, S., Schmidt, G. (1990.): Histologische Unterschiede zwischen in-vitro- und ex-vitro-Blättern bei der Abhärtung von *Rhododendron*. *Gartenbauwissenschaft*, 55(2), 49-54.
78. Wang, Y., Zhang, X., Jiang, Z., Yang, X., Liu, X., Ou, X., Su, W., Chen, R. (2023.): Establishment and Optimization of Micropropagation System for Southern Highbush Blueberry. *Horticulturae*, 9(8), 893.
79. Wardle, K., Short, K.C. (1983.): Stomatal response of in vitro cultured plantlets. I. Responses in epidermal strips of *Chrysanthemum* to environmental factors and growth regulators. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 178(8), 619-624.
80. Wetzstein, H.Y., Sommer, H.E. (1983.): Scanning electron microscopy of in vitro-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108:475-480.

81. Wetzstein, H.Y., Sommer, H.E. (1982.): Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *American Journal of Botany*, 69(10), 1579-1586.
82. Younas, T., Umer, M., Gondal, A.H., Aziz, H., Khan, M.S., Jabbar, A., Shahzad, H., Panduro-Tenazoa, N.M., Jamil, M., Areche, F.O. (2022.): A comprehensive review on impact of microorganisms on soil and plant. *Journal of Bioresource Management*, 9(2), 12.
83. Zhang, F.G., Yuan, J., Yang, Z.M., Cui, Y.Q., Chen, L.X., Ran, W., Shen, Q. (2013.): Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization. *Plant Soil*, 368: 433-444.
84. Zhang, Y., Liu, F., Wang, B., Wu, H., Wu, J., Liu, J., Sun, Y., Cheng, C., Qiu, D. (2021.): Identification, Characterization and Expression Analysis of Anthocyanin Biosynthesis-related bHLH Genes in Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13274.

Internet izvori

85. <https://www.fao.org/faostat/en/#home> (Pristupljeno 25.06.2024.)
86. <https://www.tecnologiahorticola.com/variedades-arandanos/> (Pristupljeno 28.06.2024.)
87. https://www.cedar-agro.hr/szb_ponuda/Proeco-katalog.pdf (Pristupljeno 01.07.2024.)
88. <https://njaes.rutgers.edu/fs419/> (Pristupljeno 04.07.2024.)
89. <https://minnetonkaorchards.com/bluecrop-blueberry/> (Pristupljeno 04.07.2024.)
90. <https://www.oblueberry.com/variety/legacy/> (Pristupljeno 04.07.2024.)
91. <https://www.shrubhub.com/Shop-Plants/Blueberry-Bushes/Duke-Blueberry/14719> (Pristupljeno 04.07.2024.)
92. <https://www.gardeners.com/buy/van-zyverden-blueberry-bluecrop/8613896.html> (Pristupljeno 04.07.2024.)
93. [The NC Blueberry Journal: Blueberry cultivar 'LEGACY'](#) (Pristupljeno 10.07.2024.)
94. <https://www.gurneys.com/product/duke-blueberry> (Pristupljeno 10.07.2024.)
95. <https://www.flintstone.co.rs/zemlja-za-rododendron-florimo/> (Pristupljeno 22.08.2024.)

8. SAŽETAK

Efektivni mikroorganizmi (EMO) predstavljaju mješovite kulture korisnih mikroorganizama, a njihova primjena u kulturi biljnog tkiva *in vitro* nije uobičajena niti široko istražena. Na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS), u okviru laboratorija za voćarstvo, provedeno je istraživanje s ciljem ispitivanja primjene EMO tijekom faza rizogeneze i aklimatizacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) prilikom prijelaza iz *in vitro* u *ex vitro* uvjete. Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajne razlike u stopama preživljavanja između primijenjenih tretmana i kultivara nakon aklimatizacije. Najveća stopa preživljavanja zabilježena je kod kultivara Duke (43,4 %), dok su Bluecrop (18 %) i Legacy (8,7 %) imali znatno niže stope. Tretman T2 (*Trichoderma koningii* i *Trichoderma harzianum*) pokazao se kao najdjelotvorniji, s 32 % preživjelih izdanaka, nadmašivši kontrolu (29,3 %), dok su ostali tretmani rezultirali nižim stopama preživljavanja. Nisu pronađene statistički značajne razlike u duljini izdanaka, broju korjenčića ili duljini korjenčića između tretmana, osim u broju listova (> 0,5 cm), gdje je kontrola pokazala bolje rezultate. Iako *Trichoderma spp.* nije imala značajan utjecaj na broj i duljinu korjenčića, tretman T2 dao je bolje rezultate s tim parametrima u usporedbi s ostalim tretmanima. Visoke koncentracije EMO i NAA vjerojatno su imale toksičan učinak na kultivare Bluecrop i Legacy, uzrokujući posmeđenje i odumiranje izdanaka, osobito kod kultivara Legacy. Potrebna su daljnja istraživanja s različitim koncentracijama EMO i NAA kako bi se ovi učinci bolje razumjeli.

9. SUMMARY

Effective Microorganisms (EMO) represent mixed cultures of beneficial microorganisms, and their application in *in vitro* plant tissue culture is neither common nor widely researched. At the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek (FAZOS), within the fruit growing laboratory, a study was conducted with the aim of examining the application of EMO during the rhizogenesis and acclimatization phases of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) from *in vitro* to *ex vitro* conditions. The results of this study revealed significant differences in survival rates between the applied treatments and cultivars after acclimatization. The highest survival rate was recorded in the Duke cultivar (43.4 %), while Bluecrop (18 %) and Legacy (8.7 %) exhibited significantly lower rates. Treatment T2 (*Trichoderma koningii* and *Trichoderma harzianum*) proved to be the most effective, with 32 % of surviving shoots, outperforming the control (29.3 %), while other treatments resulted in lower survival rates. No statistically significant differences were found in shoot length, root number, or root length between treatments, except in the number of leaves (> 0.5 cm), where the control showed better results. Although *Trichoderma spp.* did not have a significant effect on root number and length, treatment T2 showed better results in these parameters compared to other treatments. High concentrations of EMO and NAA likely had a toxic effect on the Bluecrop and Legacy cultivars, causing browning and shoot dieback, particularly in the Legacy cultivar. Further research with different concentrations of EMO and NAA is needed to better understand these effects.

10. PRILOZI

KONTOLNI TRETMAN K



Kontrolni tretman K (bez EMO) kronologija: 0 dan – 15 dan – 30 dan (Bižić, 2024.)



TRETMAN T1



Tretman T1 (*Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, endomikoriza) kronologija: 0 dan – 15 dan – 30 dan (Bižić, 2024.)



TRETMAN T2



Tretman T2 (*Trichoderma koningii* i *Trichoderma harzianum*) kronologija: 0 dan – 15 dan – 30 dan (Bižić, 2024.)



TRETMAN T3



Tretman T3 (Bez EMO + NAA) kronologija: 0 dan – 15 dan – 30 dan (Bižić, 2024.)



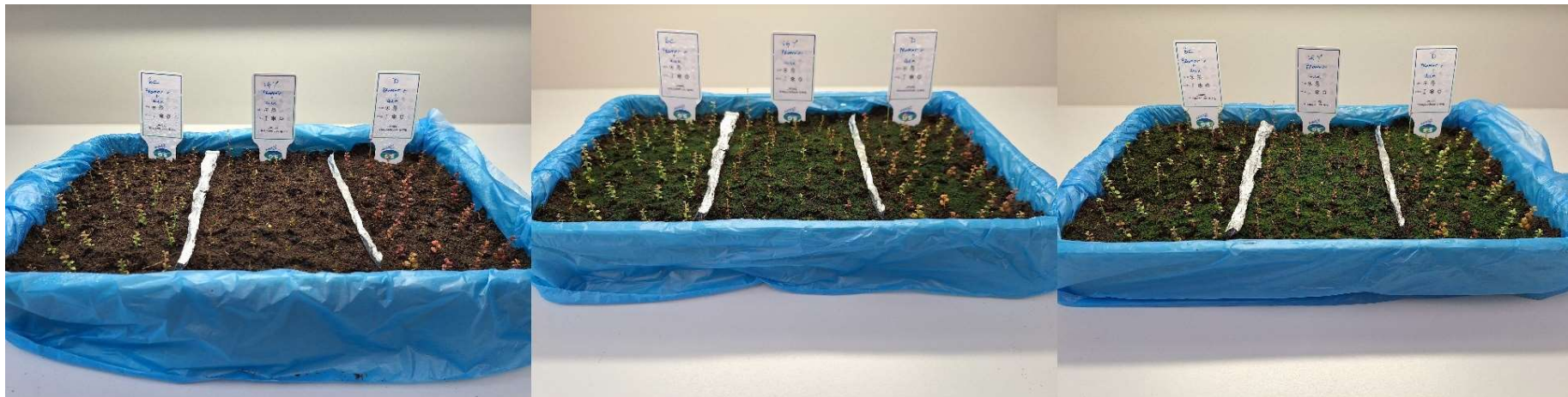
TRETMAN T4



Tretman T4 (*Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, endomi. + NAA) kronologija: 0 dan – 15 dan – 30 dan (Bižić, 2024.)



TRETMAN T5



Tretman T5 (*Trichoderma koningii* i *Trichoderma harzianum* + NAA) kronologija: 0 dan – 15 dan – 30 dan (Bižić, 2024.)



11. POPIS TABLICA

Tablica 1. Dijagram dozrijevanja kultivara u istraživanju.....	17
Tablica 2. Tretmani u istraživanju.....	18
Tablica 3. Prosječna dužina izdanaka po kultivaru, tretmanu i na razini pokusa.....	23
Tablica 4. Broj i stopa (%) preživjelih izdanaka u pokusu.....	24
Tablica 5. Prosječna dužina izdanaka, broj pravih listova, broj i dužina korjenčića u istraživanju (*ND – no data, nema podataka).....	25
Tablica 6. Statističke razlike između tretmana na razini cijelog pokusa za promatrane parametre dužina izdanaka, broj pravih listova, broj korjenčića i dužina korjenčića.....	28

12. POPIS SLIKA

Slika 1. Interakcija mikroba s korijenom.....	6
Slika 2. <i>V. floribundum</i> u <i>ex vitro</i> uvjetima nakon 1 dana (A) i 6 mjeseci (B).....	7
Slika 3. Elektronski mikrograf puči u listovima: biljke uzgojene u stakleniku <i>ex vitro</i> (A) i <i>in vitro</i> biljke (B).....	8
Slika 4. Mehanizmi rizobakterija – poboljšanje rasta i razvoja.....	11
Slika 5. Kultivari u istraživanju: a. Bluecrop, b. Legacy, c. Duke.....	16
Slika 6. Korišteni supstrat u istraživanju.....	17
Slika 7. Miješanje supstrata.....	19
Slika 8. Vaganje EMO.....	19
Slika 9. Biljni materijal <i>in vitro</i>	20
Slika 10. Disekcija kalusa i izdanaka.....	20
Slika 11. Inicijacija izdanaka u aklimatizacijske posude: a. priprema rupa za izdanke, b. aplikacija tretmana s NAA, c. umetanje izdanka u sadno mjesto, d. konačni izgled tretmana.....	21
Slika 12. Razlike između kontrolnog tretmana K i tretmana T2 po kultivarima: a. Bluecrop, b. Legacy i c. Duke (preživljavanje i izgled izdanaka) nakon 30 dana aklimatizacije.....	32
Slika 13. Izgled korijena na izdanku kontrolnog tretmana K i tretmana T2 – kultivar Duke.....	32

13. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Svjetska proizvodnja borovnice (1999. – 2022.)	3
Grafikon 2. Utjecaj temperature na razvoj <i>T. Harzianum</i>	13
Grafikon 3. Razlike u stopi preživljavanja na razini pokusa između primijenjenih tretmana.....	27
Grafikon 4. Razlike između tretmana u visini izdanaka na početku (0 dan) i na kraju ciklusa aklimatizacije (30 dan).....	29
Grafikon 5. Stopa preživljavanja nakon 30 dana kulture po kultivarima (D, BC i LGY) i tretmanima (K, T1, T2, T3, T4, T5).....	30
Grafikon 6. Stopa preživljavanja nakon 30 dana kulture po kultivarima na razini cijelog pokusa.....	30

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Primjena efektivnih mikroorganizama u fazi rizogeneze i aklimatizacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*

Tomislav Bižić

Sažetak: Efektivni mikroorganizmi (EMO) predstavljaju mješovite kulture korisnih mikroorganizama, a njihova primjena u kulturi biljnog tkiva *in vitro* nije uobičajena niti široko istražena. Na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS), u okviru laboratorija za voćarstvo, provedeno je istraživanje s ciljem ispitivanja primjene EMO tijekom faza rizogeneze i aklimatizacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) prilikom prijelaza iz *in vitro* u *ex vitro* uvjete. Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajne razlike u stopama preživljavanja između primijenjenih tretmana i kultivara nakon aklimatizacije. Najveća stopa preživljavanja zabilježena je kod kultivara Duke (43,4 %), dok su Bluecrop (18 %) i Legacy (8,7 %) imali znatno niže stope. Tretman T2 (*Trichoderma koningii* i *Trichoderma harzianum*) pokazao se kao najdjelotvorniji, s 32 % preživjelih izdanaka, nadmašivši kontrolu (29,3 %), dok su ostali tretmani rezultirali nižim stopama preživljavanja. Nisu pronađene statistički značajne razlike u duljini izdanaka, broju korjenčića ili duljini korjenčića između tretmana, osim u broju listova (> 0,5 cm), gdje je kontrola pokazala bolje rezultate. Iako *Trichoderma spp.* nije imala značajan utjecaj na broj i duljinu korjenčića, tretman T2 dao je bolje rezultate s tim parametrima u usporedbi s ostalim tretmanima. Visoke koncentracije EMO i NAA vjerojatno su imale toksičan učinak na kultivare Bluecrop i Legacy, uzrokujući posmeđenje i odumiranje izdanaka, osobito kod kultivara Legacy. Potrebna su daljnja istraživanja s različitim koncentracijama EMO i NAA kako bi se ovi učinci bolje razumjeli.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijeku

Mentor: dr.sc. Dejan Bošnjak

Broj stranica: 53

Broj grafikona i slika: 19

Broj tablica: 6

Broj literaturnih navoda: 84

Broj priloga: 1

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: borovnica, mikropropagacija, aklimatizacija, *Trichoderma spp.*, efektivni mikroorganizmi

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate work

Application of Effective Microorganisms in the Rhizogenesis and Acclimatization Phase of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*.

Tomislav Bižić

Abstract: Effective Microorganisms (EMO) represent mixed cultures of beneficial microorganisms, and their application in *in vitro* plant tissue culture is neither common nor widely researched. At the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek (FAZOS), within the fruit growing laboratory, a study was conducted with the aim of examining the application of EMO during the rhizogenesis and acclimatization phases of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) from *in vitro* to *ex vitro* conditions. The results of this study revealed significant differences in survival rates between the applied treatments and cultivars after acclimatization. The highest survival rate was recorded in the Duke cultivar (43.4 %), while Bluecrop (18%) and Legacy (8.7 %) exhibited significantly lower rates. Treatment T2 (*Trichoderma koningii* and *Trichoderma harzianum*) proved to be the most effective, with 32 % of surviving shoots, outperforming the control (29.3 %), while other treatments resulted in lower survival rates. No statistically significant differences were found in shoot length, root number, or root length between treatments, except in the number of leaves (> 0.5 cm), where the control showed better results. Although *Trichoderma spp.* did not have a significant effect on root number and length, treatment T2 showed better results in these parameters compared to other treatments. High concentrations of EMO and NAA likely had a toxic effect on the Bluecrop and Legacy cultivars, causing browning and shoot dieback, particularly in the Legacy cultivar. Further research with different concentrations of EMO and NAA is needed to better understand these effects.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: dr.sc. Dejan Bošnjak

Number of pages: 53

Number of figures and pictures: 19

Number of tables: 6

Number of references: 84

Number of appendices: 1

Original in: Croatian

Key words: blueberry, micropropagation, acclimatization, *Trichoderma spp.*, effective microorganisms

Reviewers:

1. Aleksandar Stanisavljević, Ph.D., full.prof, president

2. Dejan Bošnjak, Ph.D., mentor

3. Monika Tkalec Kojić, asst.prof., member

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