

Utjecaj nanočestica na organogenezu borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) in vitro

Puntarić, Mihael

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:151:108759>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



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

Mihael Puntarić

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**UTJECAJ NANOČESTICA NA ORGANOGENEZU
BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.) *IN VITRO***

Diplomski rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Mihael Puntarić

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**UTJECAJ NANOČESTICA NA ORGANOGENEZU
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 | 2 |
| 2.1. Borovnica (<i>Vaccinium spp.</i>) – uzgoj borovnice u svijetu i RH..... | 2 |
| 2.2. Značaj borovnice u ljudskoj prehrani..... | 4 |
| 2.3. Mikropropagacija borovnice..... | 7 |
| 2.4. Nanotehnologija u poljoprivredi..... | 8 |
| 2.5. Nanočestice silicija (Si – NP) u poljoprivredi..... | 11 |
| 2.5.1. Nanočestice silicija (Si – NP) kao herbicidi i gnojiva..... | 12 |
| 2.5.2. Nanočestice silicija (Si – NP) i ciljani transport proteina, nukleotida i kemikalija u biljkama..... | 13 |
| 2.5.3. Nanočestice silicija (Si – NP) kao komponenta zeolita s ciljem povećanja kapaciteta zadržavanja vode..... | 14 |
| 2.5.4. Nanočestice silicija (Si – NP) kao nanosenzori..... | 14 |
| 2.5.5. Nanočestice silicija (Si – NP) u kulturi biljnog tkiva..... | 15 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 17 |
| 3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija..... | 17 |
| 3.2. Biljni materijal u istraživanju..... | 18 |
| 3.3. Postavljanje pokusa i tretmani u istraživanju..... | 18 |
| 3.4. Mjerenja u istraživanju i obrada dobivenih podataka..... | 21 |
| 4. REZULTATI | 22 |
| 4.1. Rezultati mjerenja morfoloških parametara na kontrolnom tretmanu (K)..... | 22 |
| 4.2. Rezultati mjerenja morfoloških parametara na tretmanu 1 (SiO ₂ -NP1)..... | 24 |
| 4.3. Rezultati mjerenja morfoloških parametara na tretmanu 2 (SiO ₂ -NP2)..... | 26 |
| 5. RASPRAVA | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 6. ZAKLJUČAK..... | 32 |
| 7. POPIS LITERATURE..... | 34 |
| 8. SAŽETAK..... | 42 |
| 9. SUMMARY..... | 43 |
| 10. POPIS TABLICA..... | 44 |
| 11. POPIS SLIKA..... | 45 |
| 12. POPIS GRAFIKONA..... | 46 |
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA | |
| BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

Nanobiotehnologija je interdisciplinarno područje koje kombinira nanotehnologiju i biotehnologiju s ciljem razumijevanja i manipulacije biološkim sustavima na nano razini (miliarditom dijelu metra). Ova tehnologija je posebno značajna zbog svog potencijala u medicini, biološkim istraživanjima i biotehnoškim primjenama. Nanobiotehnologija u poljoprivredi donosi niz inovacija i poboljšanja koja mogu značajno unaprijediti učinkovitost i održivost poljoprivrednih praksi. Nanobiotehnologija može igrati ključnu ulogu u stvaranju održivije, produktivnije i ekološki prihvatljivije poljoprivrede. U novije vrijeme nanočestice silicija (Si – NP) koriste se u formama gnojiva, pesticida i herbicida te pokazuju potencijal u unaprijeđenju proizvodnje i održivoj poljoprivredi.

Borovnica (*Vaccinium spp.*) pripada bobičastom voću, a poznata je ne samo po svom izvrsnom okusu, već i po bogatstvu bioaktivnih spojeva koji pozitivno utječu na zdravlje (funkcionalna hrana, supervoće). Upravo iz tih razloga sve se više novih proizvođača u Republici Hrvatskoj okreće uzgoju ove kulture. Mikropropagacija predstavlja snažan alat za kloniranje vrsta iz roda *Vaccinium spp.*, a ovom suvremenom biotehnoškom metodom osigurava se brza i masovna proizvodnja novih kultivara.

Kombinacija nanobiotehnologije s tekućim imerznim (TIB/TIS) sustavom bioreaktora nove generacije predstavlja moderan pristup koji dodatno poboljšava proces mikropropagacije biljnih vrsta *in vitro*. Pregledom recentnih istraživanja primjene nanočestica silicijevog dioksida (SiO₂-NP) u kulturi biljnog tkiva ističe se njihov utjecaj na rast i razvoj biljaka, fiziološke parametre, otpornost na stres i bolesti te poboljšan unos hranjivih tvari.

Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje utjecaja nanočestica silicijevog dioksida (SiO₂-NP) na morfološke karakteristike borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro* u SETIS™ tekućem imerznom sustavu bioreaktora. U prvom dijelu diplomskog rada kroz pregled literature iznesene su novije spoznaje o proizvodnji borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.), nanočesticama u poljoprivredi i nanočesticama silicijevog dioksida (SiO₂-NP). Kroz poglavlje materijali i metode detaljno je opisan način provođenja istraživanja, primijene tretmana i mjerenja promatranih parametara. Analizom rezultata i rasprave donešen je zaključak o uspješnosti pokusa, odnosno mogućnosti utjecaja nanočestica silicijevog dioksida (SiO₂-NP) na morfološke karakteristike borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro* u SETIS™ tekućem imerznom sustavu bioreaktora.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Borovnica (*Vaccinium spp.*) – uzgoj borovnice u svijetu i RH

Borovnica (*Vaccinium spp.*) pripada bobičastom voću te zahtijeva vrlo specifične uvjete potrebne za uspješan uzgoj. Najveći svjetski proizvođači borovnica su Sjedinjene Američke Države, Kanada i Čile, dok u Europi dominiraju Poljska, Njemačka, Francuska, Nizozemska i Španjolska. U Hrvatskoj posljednjih godina raste interes za uzgojem borovnica te su se i površine pod ovom kulturom povećale. Prema Agenciji za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju, 2023. godine Hrvatska je imala oko 250 hektara nasada američke borovnice (APPRRR, 2023.).

U prirodi, divlja borovnica u Hrvatskoj raste uglavnom u nizinskim i gorskim područjima te se može naći u crnogoričnim i bjelogoričnim šumama. No, kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.), poznata kao američka borovnica najviše je zastupljena u zapadnoj i sjeverozapadnoj Hrvatskoj gdje se nalazi većina intenzivnih nasada. U Republici Hrvatskoj uspješno se uzgajaju visokorodni kultivari kao što su Duke, Bluecrop, Chandler, Spartan i neki drugi. Ova voćna kultura traži kvalitetan, certificiran i fitosanitarno ispravan sadni materijal, adekvatno pripremljeno tlo sa pH 4 do 5,2 uz navodnjavanje, armaturu, zaštitnu mrežu te dobro poznavane agrotehnike i pomotehnike u godinama eksploatacije.

U Hrvatskoj su većinom neprikladna zemljišta za sadnju borovnice, pa se posljednjih godina koriste alternativne metode uzgoja u vrećama ili posudama u kombinaciji s različitim supstratima odgovarajuće kiselosti koja je ključna za uspješan uzgoj borovnice. Visoka cijena i nedostatak navike konzumacije svježe borovnice kulminirali su niskom potrošnjom ove voćke u Hrvatskoj u odnosu na druge zemlje. U trgovačkim lancima, svježa borovnica se prodaje po cijeni od oko 9 do 10 € po pakiranju koje je obično manjeg formata radi lakše distribucije. Izravno od proizvođača, cijena se kreće između 6 i 8 €. Nažalost, nedostatkom domaće proizvodnje i loša tržišna politika rezultira time da se na policama trgovina vrlo često nalazi uvozna borovnica niže kvalitete (Majhen, 2020.).

Borovnice (*Vaccinium spp.*) pripadaju obitelji *Ericaceae* i obuhvaćaju otprilike 450 različitih vrsta (Luby i sur., 1991). Većina ovih vrsta je udomaćena u 20. stoljeću (Lyrene i sur., 2003). Prisutne su u raznolikim klimatskim predjelima, od otvorenih planinskih padina do umjerenih, subtropskih i borealnih područja sjeverne hemisfere (Luby i sur., 1991). Njeno porijeklo potječe iz Sjeverne Amerike, gdje su je domorodci koristili stoljećima zbog njenog

ljekovitog i prehrambenog potencijala. Domorodci su borovnice nazivali „zvjezdane bobice“ zbog oblika cvijeta na vrhu ploda, a koristili su ih ne samo u prehrani, nego i kao boju i lijek (<https://livetoplant.com/discovering-the-origin-of-blueberry-plant-a-historical-perspective/>; <https://blueberryexpert.com/articles/the-history-of-blueberries.html>).

Biljke iz roda *Vaccinium* variraju oblikom, od epifita do loza i stabala, a većina su kopneni grmovi. Neke mogu razviti krošnje, dok druge iz rizoma razvijaju nove izdanke (Luby i sur., 1991). Komercijalni uzgoj borovnica započeo je početkom 20. stoljeća zahvaljujući Elizabeth Coleman White, farmerici iz New Jerseyja i botaničaru Fredericku Covilleu. Zajedno su selekcijskim putem iz divljih kultivara borovnica razvili prve uzgojene vrste borovnica visoke kvalitete. Prva komercijalna sorta, nazvana "The Jersey Blueberry", plasirana je na tržište 1916. godine (<https://extension.illinois.edu/blogs/garden-scoop/2019-01-19-history-blueberries-native-american-staple-domesticated-superfood>).



Vaccinium corymbosum L.



Vaccinium angustifolium Aiton



Vaccinium ashei Reade



Vaccinium myrtillus L.

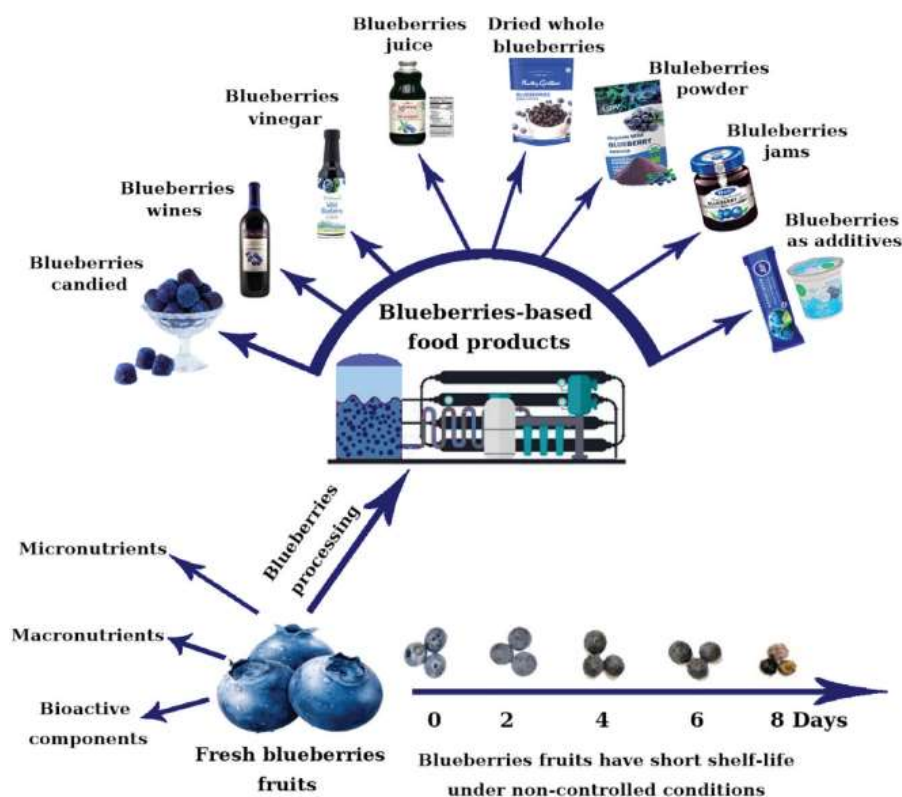
Slika 1. Vrste borovnica (*Vaccinium* spp.), (preuzeto iz Rashwan i sur., 2024.)

Značaj popularnosti borovnica značajno je porastao tijekom posljednjeg desetljeća. Dok su se prije 1990. godine uzgajale u desetak zemalja, 2011. godine uzgoj se proširio na čak 27 zemalja diljem svijeta (Michalska i Łysiak, 2015). Različite vrste borovnica su se prilagodile različitim tlama i klimatskim zonama, a razvijeni su i hibridi koji su tolerantni na različite

uvjete uzgoja (Michalska i Łysiak, 2015). Većina komercijalne proizvodnje ovog voća uključuje vrste iz sekcije *Cyanococcus*, a najčešće uzgajane vrste su: *V. corymbosum* (američka borovnica), *V. asheim* Reade (*rabbit-eye* borovnica), kao i prirodne populacije *V. angustifolium* Aiton. (borovnica niskog grma) i europska divlja borovnica (*V. myrtillus* L.), (Neto, 2007.), (Slika 1.).

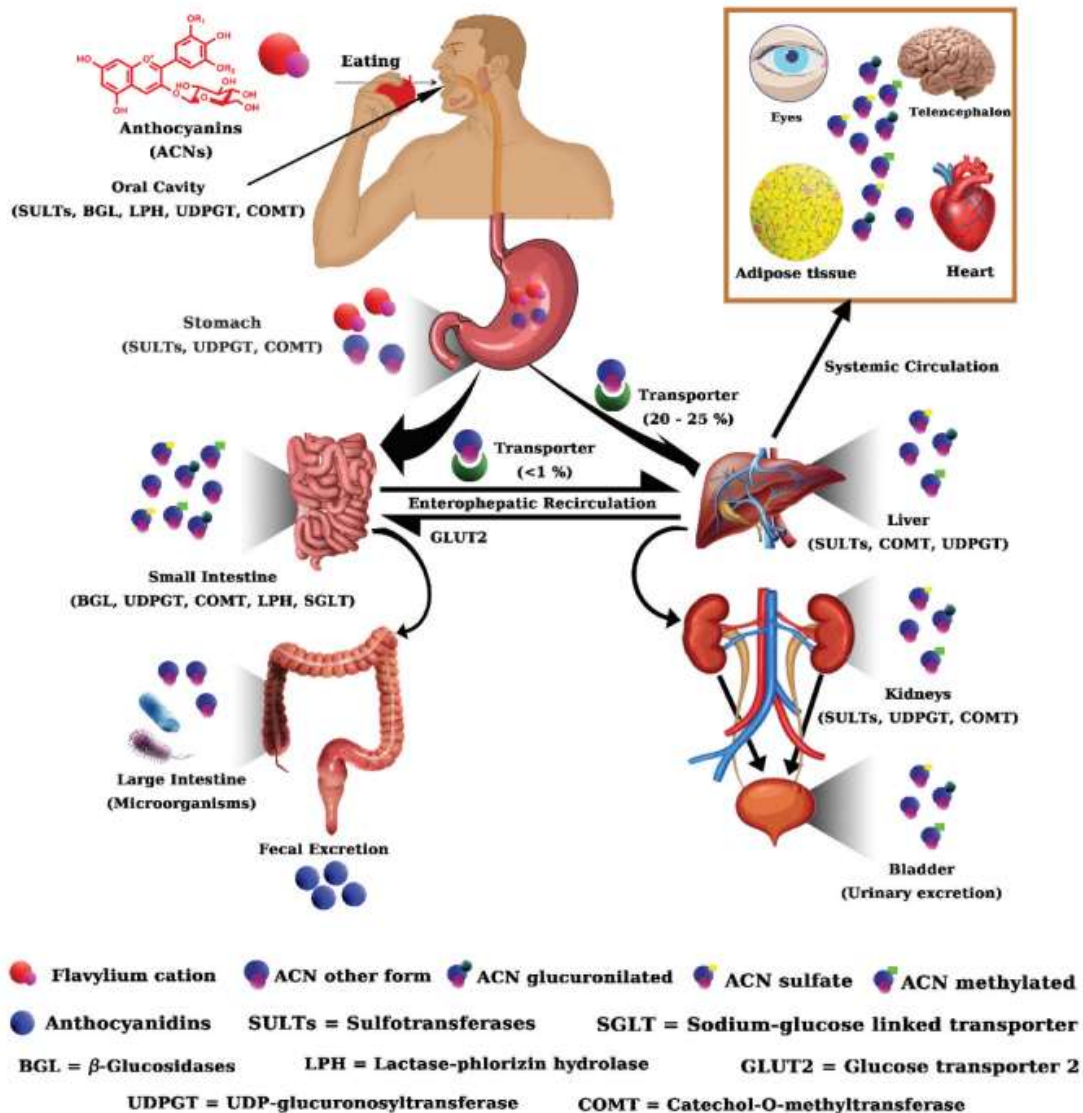
2.2. Značaj borovnice u ljudskoj prehrani

Borovnica je poznata ne samo po svom izvrsnom okusu, već i po bogatstvu bioaktivnih spojeva koji pozitivno utječu na zdravlje. Ovo ukusno bobičasto voće postalo je popularno diljem svijeta, a taj trend rasta popularnosti se posebno ističe posljednjih godina. Borovnice su tražene ne samo u svježem obliku, već i kao sastojak novih proizvoda koji promiču zdrav život (funkcionalna hrana). Ove bobice se mogu konzumirati na razne načine: kao svježe, sušene, konzervirane ili smrznute, te se često koriste u različitim kulinarskim i pekarskim proizvodima diljem svijeta. Proizvodi od borovnice, poput konzerviranih plodova, sirupa, voćnih sokova, napitaka i koncentrata, također su izuzetno popularni (Slika 2.).



Slika 2. Shematski prikaz trajnosti svježih plodova te dostupnih prehrambenih proizvoda od borovnice (preuzeto iz Rashwan i sur., 2024.)

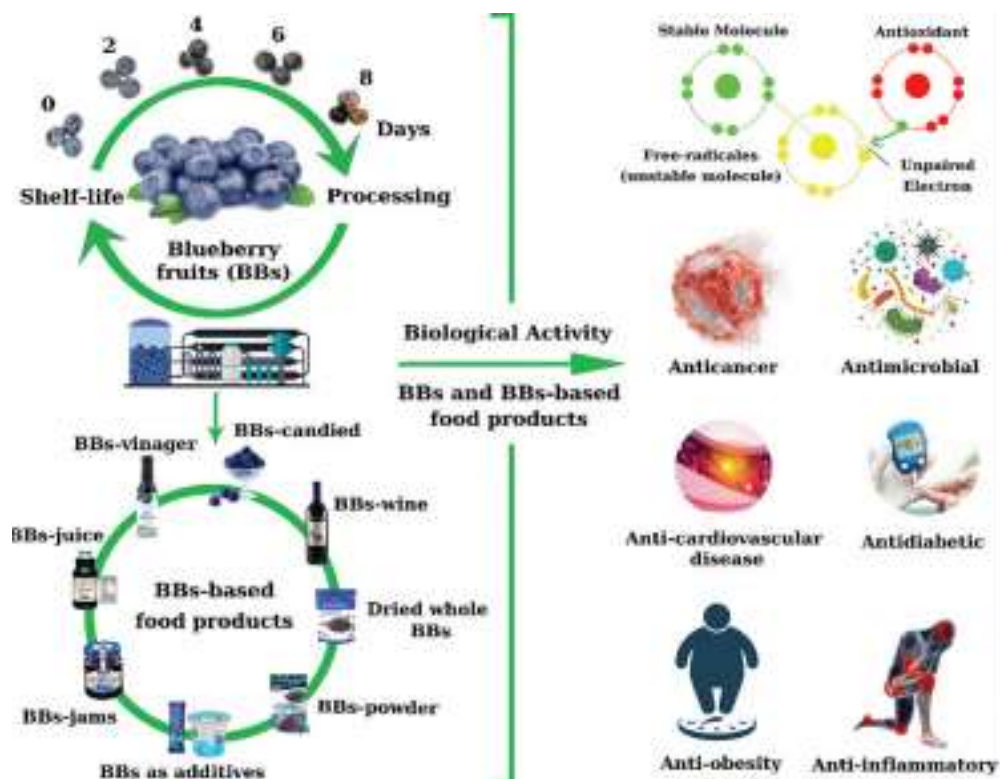
Istraživanja pojedinih znanstvenika potvrđuju pozitivnu vezu između konzumacije bobičastog voća, uključujući borovnice i smanjenja rizika od kroničnih bolesti kao što su rak, bolesti srca i dijabetes (Agustinah i sur., 2016.; Flores i sur., 2013.; Khanal i sur., 2012.). Svježe borovnice su iznimno bogate polifenolima, posebice antocijaninima koji djeluju kao snažni antioksidansi te pomažu u borbi protiv slobodnih radikala (Huntley, 2009.; Louis i sur., 2014.), (Slika 3.).



Slika 3. Shematski prikaz puteva apsorpcije, metabolizma i izlučivanja antocijanina u ljudskom tijelu (preuzeto iz Rashwan i sur., 2023.).

Osim toga, borovnice sadrže različite količine vitamina, minerala u tragovima, mikronutrijenata, enzima i dijetalnih vlakana koja pružaju dodatne koristi za zdravlje (Patel, 2014.; Seeram i sur., 2006.). Istraživanja ukazuju da borovnice imaju različite mehanizme djelovanja koji podržavaju zdravlje, uključujući antioksidativne, antibakterijske, antivirusne, antiangiogene i detoksikacijske učinke (Slika 4.). Također se vjeruje da borovnice jačaju imunološki sustav, pomažu u smanjenju krvnog tlaka te utječu na hormone u organizmu (Freitas i sur., 2008.; Howell, 2008.; McLeay i sur., 2012.; Patel, 2014.). Komponente u borovnicama uključuju raznolike spojeve, kao što su flavonoidi (antocijanini, flavonoli, proantocijanidini, stilbeni i kavinske kiseline) te triterpenoidi (ursolna kiselina i njezini esteri). Ovi spojevi doprinose antioksidativnom djelovanju, smanjujući oksidativni stres i upalu, te modulirajući gene povezane s različitim bolestima (Neto, 2007.).

U konačnici, borovnice su pravo blago u svijetu prehrane sa svojom izvanrednom nutritivnom vrijednošću i bogatstvom bioaktivnih spojeva. Svojim pozitivnim utjecajem na zdravlje i raznolikim načinima konzumacije one su postale neprocjenjiv dio modernog prehrambenog svijeta.



Slika 4. Shematski prikaz proizvoda od borovnice i utjecaja na ljudsko zdravlje (preuzeto iz Rashwan i sur., 2024.)

2.3. Mikropropagacija borovnice

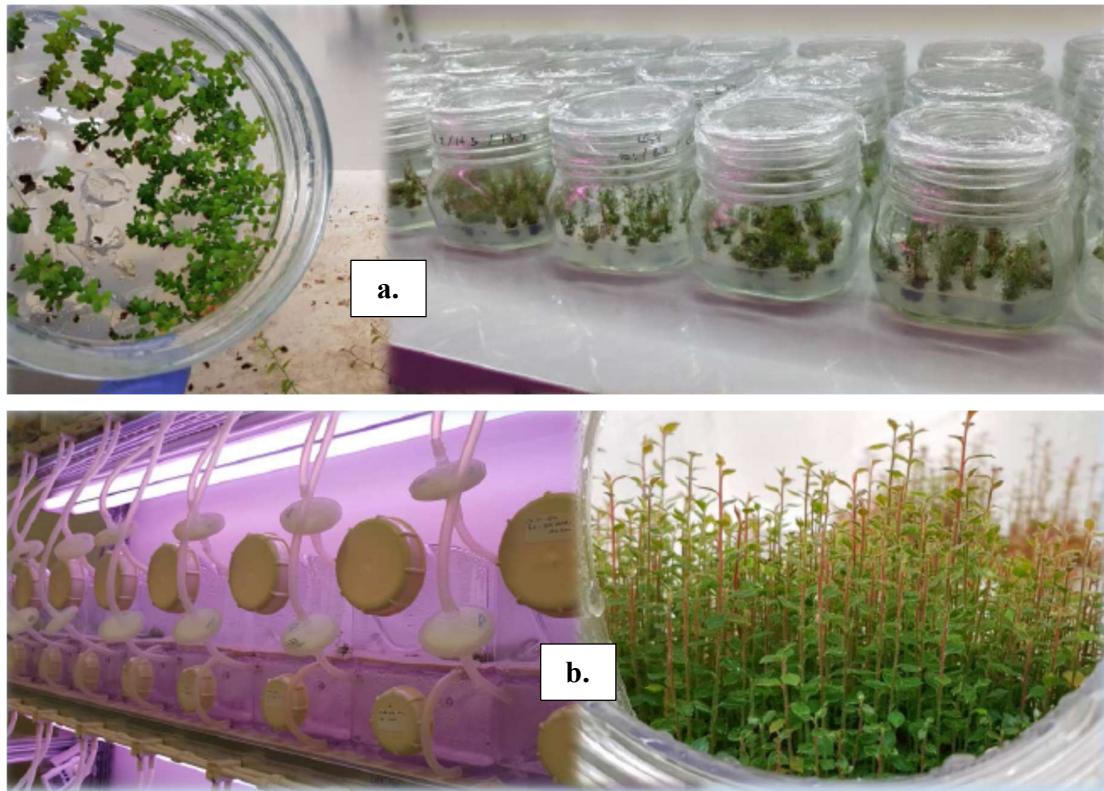
Mikropropagacija predstavlja snažan alat za kloniranje vrsta iz roda *Vaccinium spp.* Osigurava brzu i masovnu proizvodnju novih kultivara, a osigurava i uspostavu *in vitro* genetske banke ovih vrsta. *In vitro* tehnika kod ove voćne kulture u početku se koristila za brzu mikropropagaciju novonastalih kultivara uslijed njihove spore tradicionalne klonske propagacije putem reznica (Lyrene, 1978., 1980.; Reed i Abdelnour-Esquivel, 1991; Wolfe i sur., 1993). Kultivari roda *Vaccinium* pripadaju među biljke koje se već rutinski mikropropagiraju (Litwińczuk, 2013).

Nekoliko različitih osnovnih medija za rast biljaka omogućilo je učinkovitu mikropropagaciju mnogih kultivara borovnice (Song i Sink, 2004.; Tetsumura i sur., 2008.; Debnath, 2009.; Liu i sur., 2010.; Ruzic i sur., 2011., Bošnjak, 2022.). U mnogim studijama ispitivani su razni mediji u *in vitro* proliferaciji izdanaka (Lyrene, 1978., 1980.; Reed i Abdelnour-Esquivel, 1991.; Wolfe i sur., 1993.). Modificirani Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd i McCown, 1980.) s 2.35 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i vitaminima prema Murashige i Skoog (1962.) - (MS medij), dopunjen zeatinom od 18.2 μM , omogućio je učinkovitu proliferaciju aksilarnih pupova (Reed i Abdelnour-Esquivel, 1991.; Song i Sink, 2004.; Liu i sur., 2010.). Mješavina jednakih dijelova MS i WPM također je rezultirala učinkovitom mikropropagacijom četiri kultivara američke borovnice (Tetsumura i sur., 2008.). Modificirani Andersonov medij (AM) za rododendron pokazao se boljim od MS-a za *in vitro* umnožavanje na kultivaru američke borovnice 'Berkeley', 'Bluecrop' i 'Goldtraube' (Ruzic i sur., 2011.).

Ugljikohidrati (šećeri) i sredstva za geliranje (agar, slika 5a.) također utječu na mikropropagaciju borovnice. Cao i sur., (2003.) primijetili su da je 15 μM saharoze utjecalo na poboljšanu proliferaciju izdanaka, dok Song i Sink, (2004.) te Liu i sur., (2010.) iznose da je saharoza u koncentraciji od 58 μM bila također učinkovita. Upotreba imerznih bioreaktora nove generacije tipa RITA[®] i SETIS[™] (Slika 5b.) danas se uvelike koristi za razna *in vitro* istraživanja na ovoj voćnoj vrsti (Debnath, 2009., Bošnjak, 2022.).

Mikropropagacija američke borovnice ovisi o nekoliko ključnih čimbenika: (i) uspostavi kulture - koristeći mlade izdanke i grane; (ii) modificiranom WPM mediju za rast s 2.35 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i MS vitaminima, pH 5.2; (iii) za proliferaciju se koristi zeatin (4.6 – 18.2 μM) ili zeatin ribozid (2.9 – 11.4 μM) umjesto 6-(γ,γ -dimetilalilamino)-purina (2iP) (24.6 – 49.2 μM); (iv) horizontalna orijentacija eksplantat na mediju za proliferaciju potiče

produkciju izdanaka; i (v) ukorjenjivanje (rizogeneza) izdanaka *in vivo* (Song i Sink, 2004.; Liu i sur., 2010.).



Slika 5. Konvencionalni model (a., agar) i TIB/TIS sustav (b., bioreaktori, tekući medij) u *in vitro* kulturi borovnice na FAZOS-u, (Izvor: Bošnjak, 2022.)

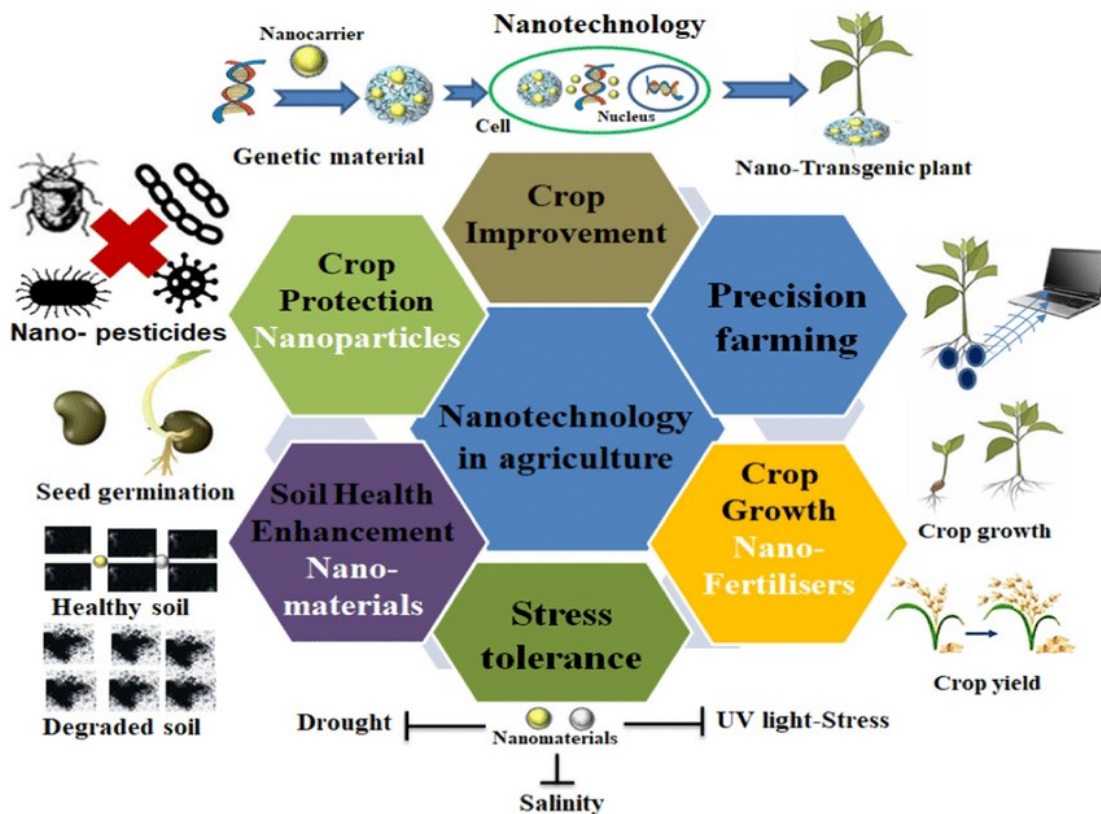
2.4. Nanotehnologija u poljoprivredi

Nanotehnologija predstavlja izazovno i uzbudljivo područje u razvoju koje nosi potencijal za revolucionarna otkrića u svim znanstvenim granama (Rico i sur., 2011.). Igra ključnu ulogu u optici, elektronici, biomedicini te istraživanju na materijalima, a sama nanotehnologija je proteklih godina donijela inovativna rješenja u raznim znanstvenim disciplinama (Sabir i sur., 2014.). Nanotehnologija temeljito istražuje nanočestice – mikroskopske skupine atoma ili molekula manje od 100 nm. Te nanočestice predstavljaju prilagođene varijacije osnovnih kemijskih elemenata, oblikovane promjenama na atomskoj i molekularnoj razini (Daniel i Astruc, 2004.; Kato, 2011.). Njihova jedinstvena privlačnost i raznolike primjene privukle su široku pažnju. Iako se nanočestice prirodno pojavljuju u mineralima, glini i produktima bakterija, posljednjih desetljeća porastao je inženjering oblikovanja ovih čestica u svrhu raznih namjena (Maurer-Jones i sur., 2013.). Nanočestice

metala i metalnih oksida ispoljavaju raznolika fiziokemijska svojstva, uključujući varijacije u površini, optici, te toplinskim i elektronskim karakteristikama. Ove čestice nastaju dodavanjem reducirajućih ili oksidirajućih tvari tijekom sinteze (Sanchez-Dominguez i sur., 2009.). Na reaktivnost nanočestica utječu mnogi čimbenici koji uključuju njihovu veličinu i oblik, sastav jezgre, površinska svojstva, čistoću, stabilnost i tehnike proizvodnje (Teske i Detweiler, 2015.).

Korištenjem nanočestica u raznim industrijama te njihovim oslobađanjem u okoliš, iste nanočestice mogu promijeniti svoja svojstva što dalje utječe na njihovu reaktivnost, prodor i put kroz biljke. Ovo može rezultirati raznolikim odgovorima samih biljaka (Rastogi i sur., 2017.). Budući da su biljke stalno u interakciji s atmosferom, tlom i vodom u kojima se mogu nalaziti nanočestice, postoji mogućnost da te iste nanočestice budu prenesene na životinje koje konzumiraju te biljke. Ovaj proces može dovesti do ulaska nanočestica u prehrambeni lanac, što može predstavljati potencijalnu opasnost za ljude (posljednju kariku u prehrambenom lancu). Iako biljke imaju ključnu ulogu u ekosustavu, utjecaj nanočestica na njihovu dinamiku još uvijek nije detaljnije istražen (Rico i sur., 2011.; Feng i sur., 2013.; Zuverza-Mena i sur., 2017.). Nedostatak odgovarajućih metoda za detekciju nanočestica u okolišu dodatno otežava ovu analizu (Navratilova i sur., 2015.; Mahdi i sur., 2017.). Među različitim tehnikama koje se koriste, masena spektrofotometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) pokazala se kao najpouzdanija za detekciju nanočestica (Navratilova i sur., 2015.; Mahdi i sur., 2017.; Hadioui i sur., 2015.).

Istraživanja provedena na različitim biljnim vrstama ukazuju da nanočestice mogu imati varijabilne učinke, bilo pozitivne ili negativne. Ti učinci ovise o čimbenicima kao što su veličina, koncentracija, kemijski sastav, zeta potencijal, stabilnost i oblik nanočestica (Mirzajani i sur., 2013.; Rafique i sur., 2014.; Nhan i sur., 2015.; Tripathi i sur., 2017.;). Postoje različita istraživanja koja ukazuju na potencijalno negativne učinke nanočestica na biljke, uključujući smanjenje rasta, produktivnosti i pigmentacije biljaka (Tripathi i sur., 2017.). Ipak, inteligentno konstruirane nanočestice koriste se kako bi se unaprijedila proizvodnja usjeva, djeluju kao stimulatori rasta, nanopestidici, nanognojiva, kondicioneri tla ili čak senzori za praćenje različitih parametara (Fraceto i sur., 2016.; Wang i sur., 2016.). Rastući interes za ovom sferom istraživanja rezultirao je većim brojem istraživanja koja opisuju utjecaj industrijskih nanočestica na biljke, a većina tih istraživanja provedena je tijekom posljednjih godina (Slika 6.).



Slika 6. Primijena nanotehnologije u poljoprivredi (preuzeto iz Nile i sur., 2022.)

Nanočestice su prisutne u različitim materijalima, ali samo nekoliko njih ima široku primjenu što može predstavljati potencijalni rizik za okoliš. Na biljkama se najčešće ispituje utjecaj nanočestica metala i metalnih oksida kao što su: titanijev dioksid, srebro, cinkov oksid i silicijev dioksid, cerijev dioksid, bakar, bakrov oksid, aluminijski oksid, nikal i željezo, budući da su ovi materijali najčešće korišteni u industriji. U proteklim godinama nanočestice su sve više upotrebljavane u poljoprivredi kao nanopesticiidi i nanognojiva (Wang i sur., 2016.; Fraceto i sur., 2016.). Primjerice, nanočestice hitozana koriste se u inkapsulaciji herbicida, čime se značajno povećava učinkovitost herbicida (Maruyama i sur., 2016.). Mezoporozne čestice silicija korištene su za sintezu DNA, proteina i drugih kemikalija u biljkama (Martin-Ortigosa i sur., 2014.). U poljoprivredi se također koriste nanozeoliti i hidrogelovi (koji se sastoje od različitih polimera poput hitozana i alginata) kako bi se poboljšala kvaliteta tla. Također, primjenjuju se i nanosenzori za praćenje zdravlja biljaka i tla. Kada je riječ o nanočesticama silicija, nije uočen štetan utjecaj na biljke (Slomberg i Schoenfisch, 2012.). Ipak, neka istraživanja su pokazala da nanočestice silicija mogu imati fitotoksični učinak uslijed promjene pH vrijednosti medija. Istraživanja su pokazala različite učinke nanočestica

na rast i razvoj biljaka, ovisno o njihovom sastavu, koncentraciji, veličini te fizičkim i kemijskim svojstvima, kao i o vrsti biljaka (Ma i sur., 2010.).

2.5. Nanočestice silicija (Si – NP) u poljoprivredi

Kao što je već prethodno rečeno, u novije vrijeme nanočestice silicija (Si – NP) koriste se u formama gnojiva, pesticida i herbicida te pokazuju potencijal u unaprijeđenju proizvodnje i održivoj poljoprivredi.

Znatan broj istraživanja je usmjeren na primjenu nanočestica silicija u funkciji pesticida (Rouhan i sur., 2012.; El-Bendary i El-Helaly, 2013.; Ziaee i Ganji, 2016; Li i sur., 2007.; Chen i sur., 2010.; Rastogi i sur., 2019.). Nanočestice silicija korištene su na dva načina: direktno aplicirane na polju u funkciji pesticida koji ubijaju insekte i ličinke, ili kao nanonosai koji su otpuštali komercijalne pesticide kako bi poboljšale njihovu učinkovitost (Tablica 1.).

Tablica 1. Nanočestice silicija kao pesticidi (preuzeto iz Rastogi i sur., 2019.)

| Oblik i veličina | Koncentracija i vrsta na koju utječe | Utjecaj | Izvor |
|--|--|---|-------------------------|
| SiO ₂ ; 20–60 | 1, 1.5, 2, i 2.5 g/kg <i>Callosobruchus maculatus</i> | Ubija insekte i ličinke ovisno od dozi Korisno u zaštiti uskladištenih žitarica | Rouhani i sur., 2012. |
| Si-NP; (-) | 200, 300, 400 i 500 ppm <i>Spodoptera littoralis</i> | Ubija insekte i ličinke ovisno od dozi Povećava dugovječnost biljke i broj listova nakon 15 dana uporabe | El-Helaly i sur., 2016. |
| SiO ₂ ; 12, 20–30 | 50, 100, 200 i 300 ppm <i>Rhizopertha dominica</i> , <i>Tribolium confusum</i> | Ubija insekte i ličinke ovisno od dozi i veličini Učinkovitije kod pšenice u odnosu na ječam Korisno u zaštiti uskladištenih žitarica | Ziaee i Ganji, 2016. |
| Oblik i veličina | Inkapsulirani pesticid | Utjecaj | Izvor |
| Si-NP; debljina ~ 15 nm, površina ~ 588 m ² g ⁻¹ , promjer pore 4–5 nm | Avermektin | Povećana fotostabilnost pesticida i sustavno otpuštanje | Li i sur., 2007. |

| | | | |
|---|-------------|--|-----------------------|
| Si-NP; površina ~ 822 m ² g ⁻¹ , promjer pore 2.4 nm | Pioluteorin | Sustavno otpuštanje (85.13 % u 28 dana) Povećana protugljivična aktivnost Pesticid se razlaže u alkalnim uvjetima, inkapsuliranjem u Si- NP ne razlaže se | Chen i sur., 2010. |
|---|-------------|--|-----------------------|

2.5.1. Nanočestice silicija (Si – NP) kao herbicidi i gnojiva

Zahvaljujući jedinstvenim fizičkim i kemijskim svojstvima nanočestica silicija, omogućen im je lagan ulazak u biljne stanice i utjecaj na rast i razvoj putem utjecaja na metabolizam biljke i njen potencijal da se obrani od štetnih utjecaja. U modernom dobu kada je fokus na povećanju produktivnosti i uništavanju korova, nanočestice silicija mogu djelovati kao posrednici u ciljanom djelovanju herbicida i gnojiva (Wanyika i sur., 2012.). Silicijevi nanonosači prenose herbicide u dijatomejskoj fistuli i dostavljaju ga u njegovom aktivnom obliku.

Kada je riječ o prijenosu gnojiva, dokazano je da primjena nanočestica silicijevog dioksida i organskog gnojiva povećava produktivnost (Janmohammadi i sur., 2016.). Mezoporozne nanočestice silicija sa specifičnom veličinom pora (2 – 10 nm) koriste se kao transportni vektor za gnojiva na bazi uree, bora i dušika (Wanyika i sur. 2012.) (Tablica 2).

Tablica 2. Nanočestice silicija i gnojiva (preuzeto iz Rastogi i sur., 2019.)

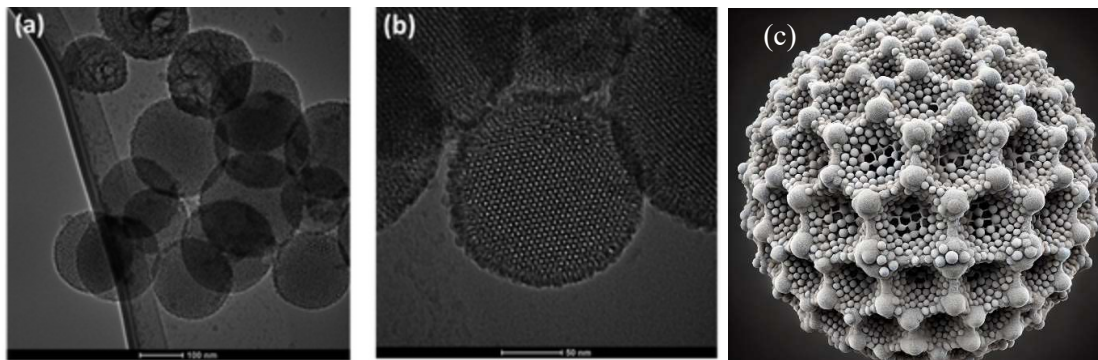
| Oblik i veličina | Herbicid/gnojivo | Utjecaj | Izvor |
|--|---------------------------------|---|-------------------------------|
| SiO ₂ NP, veličina 20– 30 nm, 180– 600 m ² g ⁻¹ | Stajski gnoj ili NPK gnojivo | Povećanje rasta uz prisustvo SiO ₂ NP | Janmohammadi i sur., 2016. |
| Si-NP; površina ~ 1000 m ² g ⁻¹ , promjer pore 25 nm | Ureaza (inakapsulirana) | Povećana adsorpcija ureaze Povećana stabilnost ureaze nakon adsorpcije Koristan model za otpuštanje dušika u tlu | Hossain i sur., 2008. |

| | | | |
|--|----------------------------|---|-----------------------|
| Si-NP; površina ~ 1013 m ² g ⁻¹ , promjer pore 2.5 nm | Ureaza (inakapsulirana) | Naglo otpuštanje uree unutar 24 sata, a sporo nakon toga Sporije otpuštanje u tlu nego u vodi | Wanyika i sur., 2012. |
|--|----------------------------|---|-----------------------|

2.5.2. Nanočestice silicija (Si – NP) i ciljani transport proteina, nukleotida i kemikalija u biljkama

Nanotehnologija potencijalno obećava u smislu kontroliranog i reguliranog otpuštanja agrokemikalija i ciljanog transporta različitih makromolekula kao što su proteini, nukleotidi, kemikalije za povećanje otpornosti i nutritivne učinkovitosti te povećanja prinosa (Nair i sur., 2010.). Nanoenkapsulacija pokazala se kao učinkovita i sigurna uporaba kemikalija koja se manje otpušta u okoliš i osigurava eko-zaštitu (Boehm i sur., 2003.). Usvajanje, djelokrug i utjecaj nanočestica na rast, razvoj i biokemijske procese u biljkama značajno varira među različitim vrstama biljaka.

Mezoporozne nanočestice silicija (Slika 7.) su kemijski i termički stabilne strukture s velikim površinama, prilagodljivom veličinom pora te nekoliko poželjnih osobina površine same čestice što ih čini pogodnima za funkciju poslužitelja. Njihova 3D struktura pora je otvorena i prilagodljive veličine što omogućuje regulaciju adsorpcije (Pérez-De-Luque i Rubiales, 2009.).



Slika 7. TEM fotografija nanočestice silicija NNV-001 (a i b) i vlastita ilustracija čestice pomoću umjetne inteligencije AI (c), (preuzeto i prilagođeno iz Rades i sur., 2014.)

Mezoporozne nanočestice silicija s obloženom površinom korisne su za transport DNA i siRNA radi svog vezujućeg afiniteta i velikog staničnog usvajanja (Xia i sur., 2009.). Dokazano je da se DNA i kemikalije (zajedno s genima i kemijskim induktorom)

transportiraju u izolirane stanice biljke i netaknute napuštaju iste preko mezoporoznih čestica silicija. Direktan transport CRe rekombinirajućeg proteina kroz pozlaćene mezoporozne čestice silicija uspješno je postignut pomoću biolističke metode (Martin-Ortigosa i sur., 2014.).

2.5.3. Nanočestice silicija (Si – NP) kao komponenta zeolita s ciljem povećanja kapaciteta zadržavanja vode

Prirodni zeoliti važna su alternativa za savladavanje utjecaja suše u sušnim regijama (Ghanbari i Ariafar, 2013.). S obzirom da je suša značajan problem u poljoprivredi, korišteni su različiti nano-zeoliti s ciljem povećanja kvalitete tla, pojačanja utjecaja kemikalija i organskih gnojiva te u konačnici povećanja prinosa (Najafi-Ghiri, 2014.). Kako bi sanirali negativne utjecaje u tlu, nanozeoliti djeluju kao sporootpuštajući izvor vode s ciljem povećanja kapaciteta zadržavanja vode u tlu (Sekhon, 2014.).

Agregacijski proces ima značajnu ulogu u poboljšanju fizikalnih karakteristika tla, primjerice provodnost vode, te infiltraciju i ventilaciju. Zeoliti i nanozeoliti olakšavaju infiltraciju vode i retenciju u tlu zahvaljujući svojim poroznim i kapilarnim svojstvima. Zeoliti djeluju kao prirodni ovlaživači i distributeri vode u tlu što utječe na provodnost vode u biljkama (Ghazavi, 2015.).

2.5.4. Nanočestice silicija (Si – NP) kao nanosenzori

Ako se funkcionalne nanočestice kao što su srebro, zlato i Eu_2O_3 u širokoj uporabi koriste kako bi se povećala senzorna moć pomoću njihove površinski poboljšane plazmatske rezonance, kod tih nanočestica postoji rizik od izmjene spektra površinske plazmatske rezonance (Jean i sur., 2010.). Nanočestice silicija uspješno su korištene kao nanosenzori za detekciju različitih metala u tlu. Struktura jezgre i ljuske kod nanočestica silicija pruža vidljivu prednost u odnosu na druge nanočestice u smislu senzorske stabilnosti, točnosti i osjetljivosti.

U kombinaciji s drugim nanočesticama, silicij ima potencijal da poveća stabilnost i osjetljivost. Kada se dobro odvojene nanočestice srebra čvrsto pripoje na površinu silicija, povećava se optička stabilnost i osjetljivost u suspenzijama, a tanki film strukturalne konfiguracije djeluje kao koloidni stabilizator i odstojnik za prostornu stabilizaciju nanočestica srebra (Jean i sur., 2010.). Nanočestice silicija s nanosferama srebra ($\text{SiO}_2@\text{Ag}$) uspješno su korištene kao optički senzor za detekciju melanina. Liu i sur., (2014.) stvorili su silicijeve nanočestice dopirane rodaminom B čija je površina obložena ugljikovim točkama

te su ih koristili kao nanosenzore za radiometrijsko fluorescentno snimanje iona bakra u vodi iz slavine. Nanočestice silicija funkcionalizirane 8- aminokinolinom korištene su kao fluorescentni nanosenzori za analizu dvovalentnih cinkovih iona u vodenim i gljivičnim staničnim suspenzijama. Navedena istraživanja govore u prilog tome da se nanočestice silicija same ili u kombinaciji s drugim nanočesticama mogu koristiti kao učinkoviti senzori s potencijalom za upotrebu u poljoprivredi.

2.5.5. Nanočestice silicija (Si – NP) u kulturi biljnog tkiva

Pregledom recentnih istraživanja primjene nanočestica silicijevog dioksida (SiO₂-NP) u kulturi biljnog tkiva ističe se njihov utjecaj na rast biljaka, otpornost na stres i unos hranjivih tvari. U nastavku je sažetak ključnih navoda iz relevantnih studija.

Učinci SiO₂-NP na rast biljaka (poboljšanje rasta): Nanočestice silicijevog dioksida značajno poboljšavaju rast biljaka. Primjerice, istraživanje na biljkama banane (El-Kady i sur., 2017.) pokazalo je da tretman SiO₂-NP u koncentracijama od 50 do 150 ppm rezultira povećanjem visine biljke, broja listova i biomase u usporedbi s kontrolnim grupama. Ovo poboljšanje pripisano je boljoj fotosintezi i poboljšanom unosu vode omogućenom djelovanjem nanočestica.

U istraživanju na podlozi dunje QA, Farhadi i sur., (2023.) uspoređivali su biogene nanočestice silicijevog dioksida (SiO₂-NP) dobivene iz rižinih ljuski i nanočestice cinkovog oksida (ZnONP) kao dodatke za poboljšanje rasta i proliferacije kultura izdanaka tijekom razdoblja od 35 dana. Utvrdili su da su *in vitro* izdanci tretirani s 1 mg/L SiO₂-NP imali najveći broj aksilarnih izdanaka, dok su biljke regenerirane iz medija s 2.5 mg/L ZnONP pokazale najveću duljinu izdanaka i broj listova.

Sharma i sur., (2023.) procijenili su upotrebu nanočestica silicijevog dioksida (SiO₂-NP) kao elicitora za povećanje proizvodnje rebaudiozida-A (reb-A) na biljnoj vrsti *Stevia rebaudiana* koje su mikropropagirane u čvrstom i tekućem mediju. Iako nisu uspjeli pronaći jasan i dosljedan obrazac za sve parametre ispitivane u različitim tretmanima, primijetili su da su različite morfološke osobine (broj izdanaka, duljina izdanaka, broj nodija, površina lista i svježja masa) bile veće u tekućem mediju nego u čvrstom, bez obzira na primijenjeni tretman s SiO₂-NP. Nasuprot tome, biljke na čvrstom mediju imale su viši sadržaj klorofila i karotenoida nego biljke na tekućem mediju, kao i veću antioksidativnu aktivnost, što ukazuje na veći stres kod izdanaka uzgajanih na čvrstom mediju. Biljke uzgojene na čvrstom mediju također su imale znatno viši sadržaj reb-A nego one u tekućem mediju. Štoviše, sadržaj reb-A dodatno se povećao u prisutnosti SiO₂-NP u čvrstom mediju, dok se suprotan

učinak dogodio u tekućem mediju. Ovi rezultati sugeriraju da se mehanizam unosa i djelovanja SiO₂-NP u čvrstom i tekućem mediju vjerojatno razlikuje.

SiO₂-NP poboljšavaju unos hranjivih tvari kod biljaka poboljšanjem dostupnosti hranjivih tvari u tlu i olakšavanjem apsorpcije putem korijena biljaka (González-Moscoso i sur., 2021.). Studija je pokazale da SiO₂-NP mogu povećati koncentracije esencijalnih hranjivih tvari poput željeza i bakra u biljnim tkivima što nam predstavlja vrijednu spoznaju za buduća istraživanja na rizogenezi eksplanata in vitro biljaka.

Veličina i površinske karakteristike SiO₂-NP igraju ključnu ulogu u njihovoj učinkovitosti. Manje nanočestice s većim površinskim područjem obično imaju izraženiji učinak na fiziološke procese biljaka (Le i sur., 2014.) Istraživanja su pokazala da se SiO₂-NP apsorbiraju kroz puči i mogu se naći unutar biljnih tkiva, što ukazuje na njihovu sposobnost učinkovite distribucije unutar biljke (Le i sur., 2014.; El-Shetehy i sur., 2021.).

Nanočestice silicijevog dioksida pokazuju značajan potencijal u poboljšanju kulture biljnog tkiva poticanjem rasta, poboljšanjem otpornosti na stres i olakšavanjem unosa hranjivih tvari. Međutim, učinkovitost može varirati ovisno o koncentraciji, načinu primjene i specifičnoj biljnoj vrsti. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razumjeli mehanizmi ovih učinaka i optimizirala primjena SiO₂-NP u kulturi biljnog tkiva.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija

Cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje utjecaja nanočestica silicijevog dioksida ($\text{SiO}_2\text{-NP}$) na morfološke karakteristike borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*. Istraživanje je provedeno u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo pri Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku (FAZOS). Laboratorij je potpuno uspostavljen za provođenje tehnike kulture biljnog tkiva *in vitro*, te je opremljen svom potrebnom opremom za mikropropagaciju (Slika 8.). U navedenom laboratoriju provode se mnoga *in vitro* istraživanja na raznim voćnim i hortikulturnim vrstama (višnja, borovnica, malina, trešnja, maslina, orah, paulovnja, lijeska, medvjeda lijeska, divizna, itd.) te vegetativnim podlogama na polučvrstom i/ili tekućem hranjivom mediju (TIB imerzni sustav bioreaktora, SETIS™).

Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo se bavi znanstveno istraživačkim radom, edukacijom studenata, ali i proizvodnjom biljnog materijala s naglaskom na razvijanje i poboljšanje protokola u cilju razvoja selekcijskog rada i oplemenjivanja voćnih vrsta.



Slika 8. Postavljanje pokusa u laminarnoj komori *in vitro* laboratorija za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, FAZOS (Puntarić, 2024.)

3.2. Biljni materijal u istraživanju

Ovo istraživanje provedeno je na kultivaru američke borovnice „Legacy“ (*Vaccinium corymbosum* L.). Kultivar je uveden u *in vitro* kulturu prijašnjih godina te se na njemu i ostalim kultivarima borovnice obavljaju *in vitro* istraživanja druge tematike (Slika 9.).



Slika 9. Borovnica (*V. corymbosum* L.) u *in vitro* kulturi na FAZOS-u (Puntarić, 2024.)

3.3. Postavljanje pokusa i tretmani u istraživanju

Ispitivan je učinak aplikacije nanočestica silicijevog dioksida ($\text{SiO}_2\text{-NP}$) u različitim koncentracijama dodanih u tekući hranjivi medij (TIB imerzni sustav bioreaktora, SETISTM, Slika 10.) na rast i morfološke karakteristike eksplantata borovnice.

Unutar laminarnog stola, eksplantati su podijeljeni na nodijalne segmente s 2 do 3 bočna aksilarna pupoljka, veličine otprilike 1 do 2 cm. Nakon disekcije, eksplantati su odmah preneseni u prethodno sterilizirane komore za rast (bioreaktore). Sve komore su sterilizirane autoklaviranjem na 120 °C tijekom 20 minuta, pri tlaku od 1,2 bara (Slika 10.).



Slika 10. Bioreaktorske jedinice SETISTM i autoklaviranje komora za rast (Puntarić, 2024.)

U istraživanju je korišten tekući hranjivi medij WPM (Woody Plant Medium), formulacija koju su osmislili Lloyd i McCown 1980. godine. Ovaj hranjivi medij koji sadrži mikroelemente, makroelemente i vitamine nabavljen je od renomiranog proizvođača Duchefa Biochemie B.V. iz Nizozemske. Svaki tretman, odnosno posuda, sadržavao je 1000 ml tekućeg medija, a detaljni sastav korištenog WPM medija naveden je u Tablici 3.

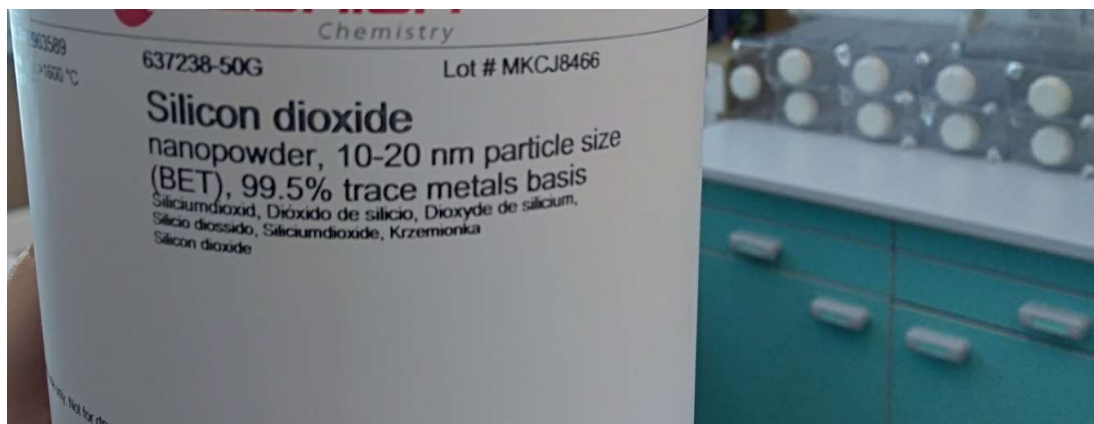
Tablica 3. Sastav korištene hranjive podloge (Duchefa catalogue, 2010-2012.)

| MICRO ELEMENTS | | |
|--|--------|--------|
| | mg/l | µM |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.25 | 1.00 |
| FeNaEDTA | 36.70 | 100.00 |
| H ₃ BO ₃ | 6.20 | 100.27 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 22.30 | 131.94 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 | 1.03 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8.60 | 29.91 |
| MACRO ELEMENTS | | |
| | mg/l | mM |
| CaCl ₂ | 72.50 | 0.65 |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | 471.26 | 2.35 |
| KH ₂ PO ₄ | 170.00 | 1.25 |
| K ₂ SO ₄ | 990.00 | 5.68 |
| MgSO ₄ | 180.54 | 1.50 |
| NH ₄ NO ₃ | 400.00 | 5.00 |
| Total concentration Micro and Macro elements: 2358.60 mg/l | | |
| VITAMINS | | |
| | mg/l | µM |
| Glycine | 2.00 | 26.64 |
| myo-Inositol | 100.00 | 554.94 |
| Nicotinic acid | 0.50 | 4.06 |
| Pyridoxine HCl | 0.50 | 2.43 |
| Thiamine HCl | 1.00 | 2.96 |

Uz WPM formulaciju i vitamine, svakom tretmanu je dodana ista koncentracija citokinina Zeatina (2 mg/l) te šećera (30 g/l), a pH vrijednost medija podešena je na 5,0 prije procesa autoklaviranja.

Nanočestice silicijevog dioksida (SiO₂-NP, Slika 11.) dodane su izravno u tekući hranjivi medij prije autoklaviranja. Raspršivanje nanočestica u otopini izvršeno je korištenjem ultrazvučnog homogenizatora Hielscher UP400St, pri čemu je homogenizacija trajala 5 minuta s amplitudom od 20 % i frekvencijom od 23,98 kHz. U tretmanima su primijenjene dvije različite koncentracije SiO₂-NP, dok je kontrolna varijanta bila bez nanočestica

(Tablica 4.). Tretman 1 (SiO₂-NP1) sadržavao je 30 mg/L nanopudera silicijevog dioksida, dok je tretman 2 (SiO₂-NP2) sadržavao 75 mg/L nanopudera silicijevog dioksida. Veličina nanočestica silicijevog dioksida bila je 10 do 20 nm (Slika 11.).



Slika 11. Korištene nanočestice silicijevog dioksida u istraživanju (Puntarić, 2024.)

Tablica 4. Tretmani s korištenim koncentracijama (mg/L) u istraživanju

| | Šifra tretmana | Koncentracija SiO ₂ -NP (mg/L) |
|------------------|-----------------------|---|
| <i>Kontrola</i> | Kontrola | 0 |
| <i>Tretman 1</i> | SiO ₂ -NP1 | 30 mg/L |
| <i>Tretman 2</i> | SiO ₂ -NP2 | 75 mg/L |

U svakom tretmanu korišteno je 100 nodijalnih segmenata borovnice, podijeljenih u dvije repeticije (ukupno 200 eksplantata po tretmanu, raspoređenih u dva bioreaktora s po 100 eksplantata). Nakon inicijalne faze multiplikacije u sterilnim uvjetima laminarne komore, tretmani su postavljeni pod uvjete svjetlosti s režimom 16 sati svjetla i 8 sati mraka, na konstantnoj temperaturi od 24 °C tijekom 45 dana. Intenzitet svjetlosti bio je 3.850 luxa, što je omogućilo optimalne uvjete za rast i razvoj eksplantata.

Frekvencija imerzije, odnosno ciklusa potapanja biljnog materijala, bila je postavljena na jednom dnevno (svakih 24 sata) s trajanjem od 4 minute, dok je ventilacija (aeracija) podešena na svakih sat vremena (24 puta dnevno) s trajanjem od 2 minute. Svi parametri imerzije i ventilacije upravljani su putem softverskog sustava i kontrolne jedinice (CPU) koja regulira rad TIB sustava SETIS™.

3.4. Mjerenja u istraživanju i obrada dobivenih podataka

Nakon 30 dana kulture, pristupilo se mjerenju morfoloških parametara te evaluaciji postavljenih tretmana u istraživanju. Prilikom mjerenja odbačeni su svi nepravilno razvijeni i zakržljali eksplantati (oni koji ne bi mogli poslužiti kao izvor novog biljnog materijala za daljnju fazu multiplikacije). Iz svakog tretmana nasumično su izuzete 32 biljke na kojima je izvršeno mjerenje morfoloških parametara i parametara produktivnosti (multiplikacija). Dobiveni rezultati analizirani su standardnim statističkim metodama pomoću softverskog alata SAS Software 9.3 (2002.-2010., SAS Institute Inc., Cary, USA) i Microsoft Office Excel 2010. Korištene su sljedeće statističke metode: analiza varijance (ANOVA) i testovi statističke značajnosti utjecaja tretmana – F test i Fisherov LSD test (eng. *Least Significant Difference*) na razini značajnosti $p \leq 0,05$.

Mjereni morfološki parametri i parametri produktivnosti uključivali su:

- Broj izdanaka (prosječni broj novih izdanaka)
- Visina izdanka (prosječna dužina/visina novih izdanaka, cm)
- Broj listova (prosječan broj listova na izdancima)
- Dužina internodija (prosječna dužina internodija između dva nodija, mm)
- Broj nodija (prosječani broj nodija na izdanku)
- Multiplikacija 1 (prosječna stopa multiplikacije po izdanku)
- Multiplikacija 2 (prosječna stopa multiplikacije po broju izdanaka)

4. REZULTATI

4.1. Rezultati mjerenja morfoloških parametara na kontrolnom tretmanu (K)

Prema tablici 5. vrijednosti broja izdanaka na kontrolnom tretmanu (K) kretale se u rasponu od najmanje 1 do najviše 14 izdanaka, prosječan broj izdanaka na kontrolnom tretmanu bio je 4,09. Veličina izdanaka (cm) na kontrolnom tretmanu (K) kretala se u rasponu od 1,4 do maksimalno 4,00 cm, prosječna veličina izdanka iznosila je 2,7 cm. Broj listova po izdanku kretao se od najmanje 6 do maksimalno 15, odnosno prosječno 10,15 listova po izdanku. Broj nodija kretao se od 3,3 do 15 ili prosječno 7,62 nodija, a dužina internodija kretala se u rasponu od internodija 1,25 do maksimalno 3,36 ili prosječno 2,44 mm. Multiplikacija 1 ili produktivnost po izdanku bila je od najmanje 1,3 do maksimalno 3,3 ili prosječno 2,20, a multiplikacija 2 ili produktivnost po broju izdanaka od 7 do 19 ili prosječno 10,16 (Tablica 5.).

Tablica 5. Rezultati morfoloških parametara na kontrolnom tretmanu (K)

| <i>Tretman</i> | <i>Broj izdanaka</i> | <i>Veličina izdanka (cm)</i> | <i>Broj listova</i> | <i>Broj nodija</i> | <i>Dužina internodija (mm)</i> | <i>Multiplikacija 1</i> | <i>Multiplikacija 2</i> |
|----------------|----------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| K | 6,00 | 2,9 | 10,27 | 6,55 | 2,68 | 2,0 | 16,0 |
| K | 5,00 | 2,6 | 9,00 | 6,50 | 3,16 | 2,1 | 19,0 |
| K | 6,00 | 2,8 | 15,00 | 9,00 | 3,12 | 2,3 | 9,0 |
| K | 1,00 | 2,4 | 11,25 | 8,00 | 2,80 | 2,3 | 7,0 |
| K | 1,00 | 3,0 | 15,00 | 9,00 | 2,34 | 2,5 | 10,0 |
| K | 4,00 | 2,2 | 7,50 | 5,00 | 2,76 | 1,9 | 13,0 |
| K | 1,00 | 2,9 | 8,38 | 6,23 | 1,79 | 2,3 | 14,0 |
| K | 1,00 | 1,8 | 6,50 | 4,00 | 2,41 | 1,6 | 13,0 |
| K | 3,00 | 3,2 | 6,00 | 3,33 | 2,14 | 2,5 | 10,0 |

| | | | | | | | |
|----------------|-------------|------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| K | 3,00 | 3,4 | 8,80 | 6,80 | 2,52 | 3,0 | 6,0 |
| K | 14,00 | 3,0 | 10,29 | 7,57 | 1,25 | 2,5 | 10,0 |
| K | 1,00 | 3,7 | 11,25 | 7,00 | 2,24 | 3,0 | 18,0 |
| K | 4,00 | 4,0 | 11,33 | 9,22 | 2,31 | 2,5 | 5,0 |
| K | 2,00 | 1,7 | 9,67 | 7,00 | 2,34 | 1,3 | 8,0 |
| K | 2,00 | 3,2 | 10,75 | 8,50 | 2,25 | 2,7 | 16,0 |
| K | 3,00 | 2,5 | 8,00 | 7,00 | 3,36 | 2,0 | 10,0 |
| K | 1,00 | 3,4 | 10,15 | 7,92 | 2,50 | 3,3 | 10,0 |
| K | 2,00 | 2,0 | 20,00 | 15,00 | 2,45 | 1,7 | 5,0 |
| K | 5,00 | 2,0 | 9,00 | 8,00 | 1,81 | 1,5 | 9,0 |
| K | 8,00 | 2,6 | 8,00 | 6,33 | 2,50 | 1,9 | 13,0 |
| K | 1,00 | 2,2 | 11,80 | 8,40 | . | 1,7 | 5,0 |
| K | 2,00 | 2,9 | 7,67 | 6,00 | . | 3,0 | 9,0 |
| K | 3,00 | 2,7 | 11,50 | 10,00 | . | 2,0 | 8,0 |
| K | 12,00 | 3,0 | 14,50 | 11,00 | . | 2,2 | 13,0 |
| K | 3,00 | 2,7 | 12,63 | 10,63 | . | 1,7 | 10,0 |
| K | 7,00 | 1,4 | 8,00 | 6,50 | . | 1,3 | 5,0 |
| K | 2,00 | 2,5 | 8,00 | 6,50 | . | 2,0 | 8,0 |
| K | 4,00 | 2,8 | 8,00 | 7,00 | . | 3,0 | 6,0 |
| K | 7,00 | 2,5 | 7,50 | 5,00 | . | 2,3 | 9,0 |
| K | 8,00 | 2,2 | 9,00 | 7,00 | . | 2,0 | 8,0 |
| K | 6,00 | 2,4 | 9,00 | 8,00 | . | 2,0 | 10,0 |
| K | 3,00 | 2,9 | 11,00 | 10,00 | . | 2,6 | 13,0 |
| Prosjek | 4,09 | 2,7 | 10,15 | 7,62 | 2,44 | 2,20 | 10,16 |

4.2. Rezultati mjerenja morfoloških parametara na tretmanu 1 (SiO₂-NP1)

Prema tablici 6. na tretmanu 1 (SiO₂-NP1) broj izdanaka kretao se u rasponu od 1 do 13, odnosno prosječno 4,43 izdanka. Veličina izdanka kretala se od najmanje 1,63 do 6 cm ili prosječno 2,79 cm. Broj listova bio je u rasponu od 8 do 22 tj. prosječno 12,23. Broj nodija kretao se u rasponu od 4,25 do 18 ili prosječno 8,91. Dužina internodija iznosila je najmanje 1,84 do maksimalno 3,27 ili prosječno 2,64 mm. Multiplikacija 1 iznosila je najmanje 2,25 do najviše 5 (prosječno 2,86), a multiplikacija 2 od najmanje 2 do 42 (prosječno 11,81), (Tablica 6.).

Tablica 6. Rezultati morfoloških parametara na tretmanu 1 (SiO₂-NP1)

| <i>Tretman</i> | <i>Broj izdanaka</i> | <i>Veličina izdanka (cm)</i> | <i>Broj listova</i> | <i>Broj nodija</i> | <i>Dužina internodija (mm)</i> | <i>Multiplikacija 1</i> | <i>Multiplikacija 2</i> |
|-----------------------|----------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| SiO ₂ -NP1 | 11,00 | 1,88 | 11,83 | 8,33 | 3,14 | 2,30 | 19,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 2,00 | 2,60 | 11,40 | 8,40 | 2,14 | 3,00 | 14,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 2,00 | 3,00 | 10,83 | 9,50 | 2,50 | 3,00 | 17,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 4,00 | 2,58 | 12,00 | 11,00 | 2,72 | 2,75 | 3,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 2,00 | 1,75 | 13,00 | 10,00 | 2,71 | 3,00 | 4,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 4,00 | 2,10 | 10,25 | 8,00 | 2,48 | 2,25 | 9,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 13,00 | 2,42 | 15,00 | 10,00 | 2,83 | 2,38 | 3,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 4,00 | 1,88 | 22,00 | 18,00 | 2,89 | 2,25 | 4,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 3,00 | 1,63 | 14,33 | 10,33 | 2,72 | 2,00 | 9,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 5,00 | 2,82 | 10,33 | 6,67 | 3,05 | 2,60 | 7,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 7,00 | 3,11 | 11,93 | 9,50 | 1,84 | 2,86 | 42,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 4,00 | 2,30 | 10,00 | 8,00 | 2,18 | 2,25 | 2,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 11,00 | 3,22 | 9,00 | 7,50 | 2,54 | 3,00 | 11,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 3,00 | 2,80 | 9,00 | 6,50 | 3,27 | 3,33 | 5,00 |
| SiO ₂ -NP1 | 4,00 | 3,55 | 13,00 | 7,00 | 2,39 | 3,25 | 3,00 |

| | | | | | | | |
|----------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| SiO₂-NP1 | 3,00 | 2,43 | 20,33 | 17,33 | 2,56 | 3,00 | 15,00 |
| SiO₂-NP1 | 13,00 | 2,74 | 14,00 | 11,00 | 3,26 | 2,85 | 3,00 |
| SiO₂-NP1 | 1,00 | 6,00 | 12,50 | 8,00 | 2,57 | 5,00 | 6,00 |
| SiO₂-NP1 | 1,00 | 3,50 | 14,60 | 10,00 | 2,94 | 3,00 | 16,00 |
| SiO₂-NP1 | 6,00 | 2,68 | 11,13 | 6,63 | 2,18 | 2,83 | 19,00 |
| SiO₂-NP1 | 10,00 | 3,01 | 13,00 | 11,00 | . | 2,60 | 4,00 |
| SiO₂-NP1 | 3,00 | 3,23 | 16,00 | 10,50 | . | 3,00 | 6,00 |
| SiO₂-NP1 | 2,00 | 3,80 | 9,33 | 6,67 | . | 3,50 | 8,00 |
| SiO₂-NP1 | 4,00 | 2,98 | 10,25 | 7,67 | . | 3,00 | 37,00 |
| SiO₂-NP1 | 8,00 | 3,36 | 8,33 | 4,33 | . | 3,25 | 6,00 |
| SiO₂-NP1 | 2,00 | 2,50 | 13,14 | 8,71 | . | 2,50 | 19,00 |
| SiO₂-NP1 | 2,00 | 3,05 | 10,00 | 6,50 | . | 3,00 | 5,00 |
| SiO₂-NP1 | 5,00 | 2,64 | 8,00 | 4,25 | . | 2,80 | 9,00 |
| SiO₂-NP1 | 2,00 | 1,65 | 9,00 | 6,14 | . | 2,50 | 20,00 |
| SiO₂-NP1 | 2,00 | 2,45 | 12,75 | 8,25 | . | 2,50 | 24,00 |
| SiO₂-NP1 | 1,00 | 2,60 | 12,00 | 9,33 | . | 3,00 | 18,00 |
| SiO₂-NP1 | 1,00 | 3,10 | 13,33 | 10,00 | . | 3,00 | 11,00 |
| Prosjek | 4,53 | 2,79 | 12,23 | 8,91 | 2,64 | 2,86 | 11,81 |

4.3. Rezultati mjerenja morfoloških parametara na tretmanu 2 (SiO₂-NP2)

Prema tablici 7. na tretmanu 2 (SiO₂-NP2) broj izdanaka kretao se od najmanje vrijednosti 2 do najveće 9, odnosno prosječno 4,8 izdanka. Veličina izdanka bila je u rasponu od 1,17 do 5,37 cm (prosječno 2,86 cm). Broj listova po izdanku kretao se od najmanje 10 do najviše 19 listova (prosječno 14,5). Broj nodija bio je u rasponu od 9 do 18 (prosječno 13,2), a dužina internodija od 2,02 do 4,07 mm (prosječno 2,80 mm). Multiplikacija 1 kretala se od najmanje 1,5 do 4 (prosječno 2,92) dok se multiplikacija 2 kretala u rasponu od 3 do maksimalno 37 (prosječno 12,48), (Tablica 7.)

Tablica 7. Rezultati morfoloških parametara na tretmanu 2 (SiO₂-NP2)

| <i>Tretman</i> | <i>Broj izdanaka</i> | <i>Veličina izdanka (cm)</i> | <i>Broj listova</i> | <i>Broj nodija</i> | <i>Dužina internodija (mm)</i> | <i>Multiplikacija 1</i> | <i>Multiplikacija 2</i> |
|-----------------------|----------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| SiO ₂ -NP2 | 8,0 | 3,22 | 12,3 | 10,3 | 2,36 | 3,17 | 25,30 |
| SiO ₂ -NP2 | 9,0 | 2,92 | 12,8 | 11,1 | 3,11 | 2,80 | 6,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 4,0 | 3,07 | 12,5 | 10,8 | 2,93 | 2,83 | 6,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 3,0 | 3,00 | 12,3 | 11,0 | 2,99 | 3,00 | 11,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 4,0 | 3,50 | 18,0 | 15,3 | 2,88 | 4,00 | 6,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 7,0 | 2,13 | 13,4 | 12,3 | 3,52 | 2,25 | 9,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 6,0 | 3,00 | 16,2 | 15,2 | 3,84 | 3,00 | 31,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 8,0 | 4,50 | 13,4 | 11,5 | 2,97 | 4,00 | 9,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 4,0 | 3,20 | 15,8 | 13,8 | 2,73 | 3,00 | 6,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 2,0 | 2,17 | 16,0 | 15,0 | 2,60 | 2,33 | 13,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 4,0 | 3,09 | 18,8 | 16,8 | 2,79 | 3,00 | 20,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 6,0 | 2,00 | 15,3 | 13,8 | 3,04 | 2,00 | 9,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 2,0 | 2,50 | 19,0 | 18,0 | 2,44 | 2,75 | 33,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 6,0 | 2,40 | 16,7 | 15,7 | 2,36 | 2,50 | 10,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 6,0 | 1,80 | 15,7 | 14,3 | 2,18 | 1,50 | 13,00 |
| SiO ₂ -NP2 | 5,0 | 5,37 | 10,0 | 9,0 | 2,50 | 5,00 | 9,00 |

| | | | | | | | |
|----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| SiO₂-NP2 | 3,0 | 3,00 | 17,7 | 16,7 | 2,02 | 3,00 | 37,00 |
| SiO₂-NP2 | 3,0 | 2,45 | 13,0 | 12,0 | 2,38 | 3,00 | 5,00 |
| SiO₂-NP2 | 6,0 | 2,82 | 12,8 | 11,8 | 2,23 | 3,20 | 3,00 |
| SiO₂-NP2 | 7,0 | 2,30 | 12,7 | 11,6 | 4,07 | 2,38 | 17,00 |
| SiO₂-NP2 | 3,0 | 4,90 | 12,7 | 11,0 | . | 4,00 | 26,00 |
| SiO₂-NP2 | 3,0 | 3,25 | 15,7 | 14,7 | . | 3,00 | 9,00 |
| SiO₂-NP2 | 4,0 | 2,83 | 13,0 | 9,5 | . | 2,67 | 7,00 |
| SiO₂-NP2 | 6,0 | 2,61 | 16,2 | 15,2 | . | 3,08 | 12,00 |
| SiO₂-NP2 | 6,0 | 1,17 | 12,0 | 11,0 | . | 2,00 | 26,00 |
| SiO₂-NP2 | 4,0 | 2,90 | 12,5 | 11,5 | . | 2,71 | 5,00 |
| SiO₂-NP2 | 4,0 | 1,90 | 13,5 | 14,0 | . | 2,50 | 6,00 |
| SiO₂-NP2 | 2,0 | 1,33 | 18,0 | 17,0 | . | 2,25 | 14,00 |
| SiO₂-NP2 | 4,0 | 2,64 | 13,3 | 12,3 | . | 2,86 | 5,00 |
| SiO₂-NP2 | 4,0 | 2,80 | 13,5 | 12,5 | . | 3,00 | 5,00 |
| SiO₂-NP2 | 5,0 | 2,97 | 14,6 | 13,6 | . | 3,00 | 3,00 |
| SiO₂-NP2 | 5,0 | 3,73 | 15,6 | 14,6 | . | 3,67 | 3,00 |
| Prosjek | 4,8 | 2,86 | 14,5 | 13,2 | 2,80 | 2,92 | 12,48 |

5. RASPRAVA

Svi tretmani uspješno su generirali dovoljnu količinu biomase tijekom 30 dana kulture. Nakon isteka tog razdoblja, eksplantati u svim tretmanima bili su spremni za daljnju multiplikaciju. Tijekom mjerenja morfoloških parametara i evaluacije samih tretmana nije uočena prisutnost kontaminacije niti stresni utjecaj hranjive podloge, fititoksičnosti tretmana nanočesticama ili uvjeta u klima komori.

Tablica 8. Statističke razlike u broju izdanaka, visini izdanaka, broju listova, broju nodija i dužini internodija između primjenjenih tretmana

| <i>Tretman</i> | <i>Broj izdanaka</i> | <i>Visina izdanka (cm)</i> | <i>Broj listova</i> | <i>Broj nodija</i> | <i>Dužina internodija (mm)</i> |
|----------------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------|------------------------------------|
| Kontrola | 4,09 | 2,66 | 10,15 ^C | 7,62 ^C | 2,44 |
| SiO₂-NP1 | 4,53* | 2,79* | 12,23 ^B | 8,91 ^B | 2,64* |
| SiO₂-NP2 | 4,78** | 2,86** | 14,52 ^A | 13,20 ^A | 2,80** |
| F-test | 0,44 | 0,53 | 19,76 | 43,25 | 3,06 |
| p | 0,6423 | 0,5881 | <,0001 | <,0001 | 0,0636 |

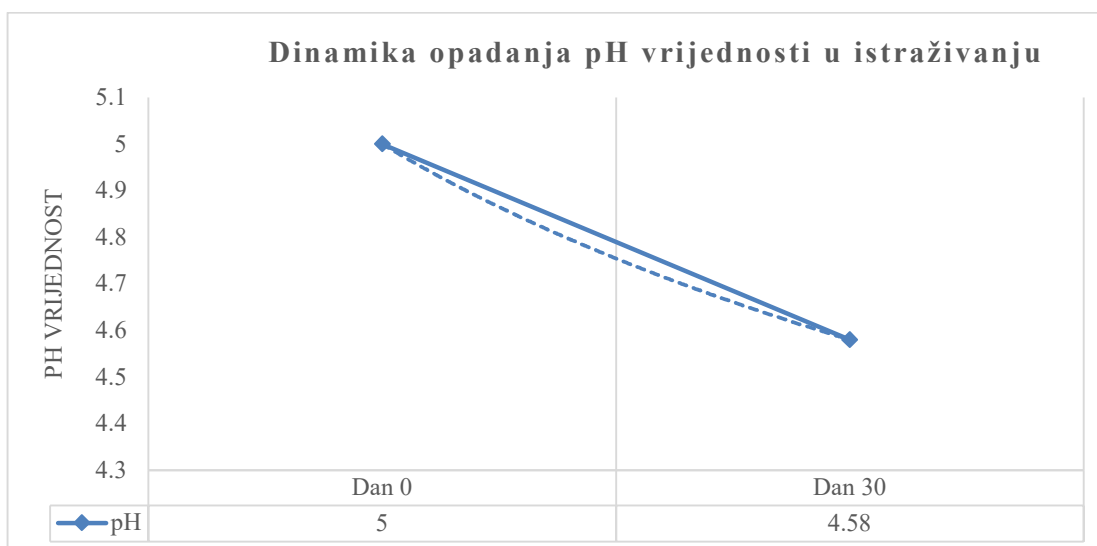
Na razini pokusa (Tablica 8.) nisu utvrđene statistički značajne razlike između primijenjenih tretmana nanočestica SiO₂ i kontrolne varijante u morfološkim parametrima: broj izdanaka ($p = 0,6423$), visina izdanka ($0,5881$) i dužina internodija ($0,0636$). Značajne razlike utvrđene su na tretmanu s većom koncentracijom nanočestica SiO₂ (75 mg/L; SiO₂-NP2) za parametar broj listova (14,52) i broj nodija (13,20). Na ovom tretmanu razvijen je značajno veći broj listova i broj nodija u odnosu na tretman s nižom koncentracijom nanočestica SiO₂ i kontrole. Također i niža koncentracija nanočestica SiO₂ (30 mg/L; SiO₂-NP1) rezultirala je značajno većim brojem listova (12,23) i nodija (8,91) u odnosu na kontrolni tretman (Tablica 8.).

Produktivnost ili multiplikacija (1) po izdanku (Tablica 9.) bila je značajno veća ($p <,0001$) na oba tretmana nanočesticama SiO₂ (SiO₂-NP1; 2,86 i SiO₂-NP2; 2,92) u odnosu na kontrolni tretman (2,20). Nema značajne razlike u multiplikaciji po broju izdanaka (multiplikacija 2) između tretmana i kontrole ($p = 0,4991$).

Tablica 9. Statističke razlike u multiplikaciji po izdanku i po broju izdanaka između primijenjenih tretmana u istraživanju

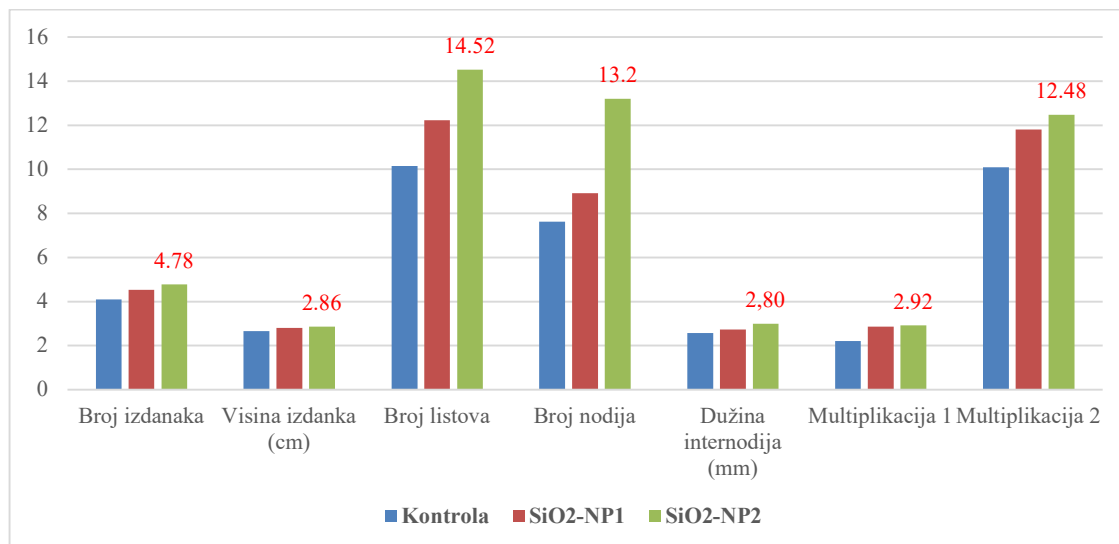
| Tretman | Multiplikacija 1 <i>(multiplikacija po izdanku)</i> | Multiplikacija 2 <i>(multiplikacija po broju izdanaka)</i> |
|----------------------------|---|--|
| Kontrola | 2,20 ^B | 10,16 |
| SiO₂-NP1 | 2,86 ^A | 11,81* |
| SiO₂-NP2 | 2,92 ^A | 12,48** |
| F-test | 15,03 | 0,70 |
| p | <,0001 | 0,4991 |

Jedan od izazova pri korištenju tekućeg hranjivog medija je stabilnost pH vrijednosti medija (Bošnjak i sur., 2021.). Prije autoklaviranja, pH medija bio je podešen na 5,0, ali je po završetku istraživanja (nakon 30 dana uzgoja) došlo do degradacije, odnosno opadanja pH vrijednosti na svim tretmanima s postavljenih 5,0 na prosječno 4,58 (Grafikon 1.). Biljni materijal tijekom rasta apsorbira mineralne komponente iz medija, što pridonosi snižavanju pH i konduktivnosti (Bošnjak i sur., 2021.). Unatoč degradaciji pH vrijednosti, nisu zabilježeni štetni učinci na biljni materijal niti na samu fazu multiplikacije u istraživanju. Vrijednost pH od 4,58 i dalje je povoljna za borovnicu, koja je acidofilna biljka i preferira pH vrijednosti u rasponu između 4,5 i 5,0.



Grafikon 1. Dinamika opadanja pH vrijednosti u istraživanju

El-Kady i sur., (2017.) ispitivali su učinke nanočestica SiO₂ na sadnicama banane tijekom faze ukorjenjivanja (rizogeneze) *in vitro*. Utvrđeno je da primjena nano-SiO₂ u različitim koncentracijama (0, 50, 100 i 150 ppm) poboljšava nekoliko morfoloških svojstava, stopu ukorjenjivanja i ukupni sadržaj klorofila. Autori iznose da nano-SiO₂ pozitivno utječe na parametre rasta što ujedno potencijalno dovodi i do povećanja broja listova u kulturi tkiva banane. Novije istraživanje proveli su Seyed Hajizadeh i sur., (2023.) koji su se usredotočili na biljke damaščanske ruže u simuliranim uvjetima stresa od suše. Primjena nanočestica SiO₂ poboljšala je svojstva rasta kao što su duljina stabljike i sadržaj klorofila. Istraživanja na *Thymus serpyllum* L. (Mustafa i Toaiema, 2022.) i vegetativnim podlogama jabuke (Avestan i sur., 2016.) ukazuju da nanočestice SiO₂ mogu povećati stopu proliferacije *in vitro* ali i broj listova na izdancima. Avestan i sur., (2016.) iznose da je dodatak nanosilicijevog dioksida u koncentraciji od 100 mg (nano SiO₂) u MS mediju bio najoptimalniji za postizanje maksimalnog vegetativnog rasta, boja i boje listova na eksplantatima vegetativnih podloga za jabuku. Također i Rahimi i sur., (2011) iznose pozitivne učinke silicija na broj listova po biljci i indeks lisne površine kod biljaka *Portulaca oleracea* L. Nanočestice olakšavaju bolju apsorpciju hranjivih tvari i poboljšavaju fiziološke reakcije. Benefitni učinci nano-SiO₂ pripisuju se njegovoj sposobnosti da lako penetrira u biljne stanice i njegovom visokom omjeru površine i volumena (eng. „*high surface area-to-volume ratio*“) koji pojačava biokemijsku aktivnost. Poznato je da silicij ojačava stanične stijenke, poboljšava otpornost na stres i unos hranjivih tvari (Singh i sur., 2023.; Goswami i sur., 2022.).



Grafikon 2. Grafički prikaz učinka tretmana SiO₂-NP na morfološke parametre i pokazatelje produktivnosti multiplikacije borovnice *in vitro*

Sva navedena istraživanja o primjeni nano-silicijevog dioksida u kulturi biljnog tkiva pokazuju obećavajuće rezultate u poboljšanju parametara rasta što je u suglasnosti s našim rezultatima. Ovi učinci povezani su s poboljšanim fiziološkim odgovorima i u normalnim i u stresnim uvjetima čineći nanočestice SiO₂ vrijednim alatom u tehnici razmnožavanja biljaka *in vitro*. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se optimizirale koncentracije i temeljitije razumjeli mehanizmi koji leže u pozadini.

U našem istraživanju vidljivo je da su nanočestice u obje koncentracije utjecale na razvoj značajno većeg broja listova i nodija na izdancima borovnice u odnosu na kontrolni tretman (bez nanočestica). Također i ostali morfološki parametri broj i visina izdanaka te dužina internodija i multiplikacija po broju izdanaka bili su veći na tretmanima sa silicijem u odnosu na kontrolu ali ne značajno. Iz naših rezultata vidljivo je da povećanje koncentracije nanočestica SiO₂ stimulatивно utječe na povećanje morfoloških parametara te parametara produktivnosti (multiplikacije), (Grafikon 2.).

Ovi rezultati ističu vrijednost i potencijal primjene nanočestica SiO₂ u biljnoj biotehnologiji, s naglaskom na poboljšanje učinkovitosti *in vitro* metoda razmnožavanja unutar tekućeg imerznog sustava bioreaktora. Daljnja istraživanja trebala bi se usmjeriti na ispitivanje većih koncentracija i razumijevanje mehanizama koji stoje iza opaženih učinaka, kao i na optimizaciju njihove primjene na raznim biljnim i voćnim vrstama.

6. ZAKLJUČAK

Kombinacija nanobiotehnologije s tekućim imerznim (TIB/TIS) sustavom bioreaktora nove generacije predstavlja moderan pristup koji dodatno poboljšava proces mikropropagacije biljnih vrsta *in vitro*. Eksperimentalni dio ovog diplomskog rada proveden je u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS).

Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje utjecaja nanočestica silicijevog dioksida ($\text{SiO}_2\text{-NP}$) na morfološke karakteristike borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro* u SETIS™ tekućem imerznom sustavu bioreaktora.

Na temelju dobivenih rezultata u ovom diplomskom radu donosimo sljedeće zaključke:

- ✚ Svi tretmani uspješno su proizveli dovoljnu količinu biomase unutar 30 dana kulture. Po završetku tog razdoblja, eksplantati u svim tretmanima bili su spremni za daljnju multiplikaciju. Tijekom procjene morfoloških parametara i evaluacije tretmana nije zabilježena kontaminacija niti stresni utjecaji hranjive podloge, fitotoksičnosti nanočestičnih tretmana ili uvjeta u klima komori.
- ✚ Na razini pokusa nisu utvrđene statistički značajne razlike između primijenjenih tretmana nanočestica SiO_2 i kontrolne varijante u morfološkim parametrima: broj izdanaka, visina izdanka i dužina internodija.
- ✚ Značajne razlike utvrđene su kod tretmana s većom koncentracijom nanočestica SiO_2 (75 mg/L), gdje je zabilježen veći broj listova i nodija u odnosu na tretman s nižom koncentracijom i kontrolu.
- ✚ Niža koncentracija nanočestica SiO_2 (30 mg/L) rezultirala je značajno većim brojem listova i nodija u usporedbi s kontrolnim tretmanom.
- ✚ Produktivnost ili multiplikacija po izdanku bila je značajno veća na oba tretmana s nanočesticama SiO_2 u usporedbi s kontrolnim tretmanom. S druge strane, nije utvrđena značajna razlika u multiplikaciji po broju izdanaka između tretmana i kontrolne varijante.
- ✚ Po završetku istraživanja (nakon 30 dana uzgoja) došlo do degradacije pH vrijednosti na svim tretmanima s postavljenih 5,0 na prosječno 4,58. Unatoč degradaciji pH vrijednosti, nisu zabilježeni štetni učinci na biljni materijal niti na samu fazu multiplikacije u

istraživanju. Vrijednost pH od 4,58 i dalje je povoljna za borovnicu, koja je acidofilna biljka i preferira pH vrijednosti u rasponu između 4,5 i 5,0.

- ✚ U našem istraživanju vidljivo je da su nanočestice u obje koncentracije utjecale na razvoj značajno većeg broja listova i nodija na izdancima borovnice u odnosu na kontrolni tretman (bez nanočestica). Također i ostali morfološki parametri broj i visina izdanaka te dužina internodija i multiplikacija po broju izdanaka bili su veći na tretmanima sa silicijem u odnosu na kontrolu ali ne značajno.
- ✚ Iz naših rezultata vidljivo je da povećanje koncentracije nanočestica SiO₂ stimulatивно utječe na povećanje morfoloških parametara te parametara produktivnosti (multiplikacije).
- ✚ Ovi rezultati ističu vrijednost i potencijal primjene nanočestica SiO₂ u biljnoj biotehnologiji s naglaskom na poboljšanje učinkovitosti *in vitro* metoda razmnožavanja unutar tekućeg imerznog sustava bioreaktora.
- ✚ Daljnja istraživanja trebala bi se usmjeriti na ispitivanje većih koncentracija i razumijevanje mehanizama koji stoje iza opaženih učinaka, kao i na optimizaciju njihove primjene na raznim biljnim i voćnim vrstama.

7. POPIS LITERATURE

1. Avestan, S., Naseri, L.A., Hassanzade, A., Sokri, S.M., Barker, A.V. (2016.): Effects of nanosilicon dioxide application on in vitro proliferation of apple rootstock. *Journal of Plant Nutrition*, 39(6), 850-855.
2. Agustinah, W., Sarkar, D., Woods, F., Shetty, K., (2016.): Apple and blueberry synergies for designing bioactive ingredients for the management of early stages of type 2 diabetes. *J. Food Qual.* 39 (4), 370-382.
3. Boehm, A., Martinon, I., Zerrouk, R., Rump, E., Fessi, H. (2003.): Nanoprecipitation technique for the encapsulation of agrochemical active ingredients. *Journal of Microencapsulation*, 20(4): 433-441.
4. Bošnjak, D., Marković, M., Agić, D., Vinković, T., Tkalec Kojić, M., Ravnjak, B., Stanisavljević, A. (2021.): The Influence of Nutrient Media Modification on the Morphological Parameters in Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Micropropagation in the Liquid and Semi-solid Media. *Poljoprivreda/Agriculture*, 27:2021(1):22-29.
5. Bošnjak, D. (2022.): Optimizacija mikropropagacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) primjenom nanobiotehnologije u tekućem imerznom (TIB/TIS) sustavu bioreaktora (Doctoral dissertation, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek. Department of Plant Production and Biotechnology).
6. Cao, X., Fordham, I., Douglass, L., Hammerschlag, F. (2003.): Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from in vitro propagated highbush blueberry shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75, 255–259.
7. Chen, J., Wang, W., Xu, Y., Zhang, X. (2010.): Slow-Release Formulation of a New Biological Pesticide, Pyoluteorin, with Mesoporous Silica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1): 307-311.
8. Daniel, M., Astruc, D. (2004.): Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *ChemInform*, 35(16).
9. Debnath, S.C. (2009.): A scale-up system for lowbush blueberry micropropagation using a bioreactor. *HortScience* 44, 1962–1966.

10. El-Bendary, H.M., El-Helaly, A.A. (2013.): First record nanotechnology in agricultural: silica nano-particles a potential new insecticide for pest control. *App Sci Rep*, 4(3):241–246.
11. El-Kady, M.E., El-Boray, M.S., Shalan, A.M., Mohamed, L.M. (2017.): Effect of silicon dioxide nanoparticles on growth improvement of banana shoots in vitro within rooting stage. *Journal of Plant Production*, 8(9), 913-916.
12. El-Shetehy, M., Moradi, A., Maceroni, M., Reinhardt, D., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., Schwab, F. (2021.): Silica nanoparticles enhance disease resistance in *Arabidopsis* plants. *Nature Nanotechnology*, 16(3), 344-353.
13. Farhadi, S., Ma'mani, L., Kermani, M. J., Ghanbari, A., Naji, A. M., Zeinalabedini, M., Mahdavi, V. (2023.): Rice husk-derived biogenic silica nanoparticles and zinc oxide nanoparticles as nano-additives for improving in vitro quince rootstock propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 155(2), 531-539.
14. Feng, Y., Cui, X., He, S. (2013.): The role of metal nanoparticles in influencing arbuscular mycorrhizal fungi effects on plant growth. *Environ Sci Technol* 47(16):9496–9504.
15. Fraceto, L.F., Grillo, R., de Medeiros, G.A., Scognamiglio, V., Rea, G., Bartolucci, C. (2016.): Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? *Front. Environ. Sci.*, 4:20.
16. Freitas, P.S., Andrade, S.F.D., Maistro, E.L., 2008. Evaluation of the in vivo mutagenic potential of hydroalcoholic extracts of the northern Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. Ericales, Ericaceae) on peripheral blood cells of Swiss mice (*Mus musculus* Rodentia, Muridae). *Genet. Mol. Biol.* 31 (2), 555560.
17. Flores, F.P., Singh, R.K., Kerr, W.L., Pegg, R.B., Kong, F. (2013.): Antioxidant and enzyme inhibitory activities of blueberry anthocyanins prepared using different solvents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(18), 4441-4447.
18. Goswami, P., Mathur, J., Srivastava, N. (2022.): Silica nanoparticles as novel sustainable approach for plant growth and crop protection. *Heliyon*, 8(7).
19. González-Moscoso, M., Martínez-Villegas, N.V., Meza-Figueroa, D., Rivera-Cruz, M.D.C., Cadenas-Pliego, G., Juárez-Maldonado, A. (2021.): SiO₂ Nanoparticles improve nutrient uptake in tomato plants developed in the presence of arsenic. *Revista bio ciencias*, 8.

20. Hadioui, M., Merdzan, V., Wilkinson, K.J. (2015.): Detection and characterization of ZnO nanoparticles in surface and waste waters using single particle ICPMS. *Environ. Sci. Technol.*, 49: 6141–6148.
21. Ghazavi, R. (2015.): The application effects of natural zeolite on soil runoff, soil drainage and some chemical soil properties in arid land area. *Int J Innov Appl Stud*, 13(1): 172–177.
22. Ghanbari, M., Ariaifar, S. (2013.): The effect of water deficit and zeolite application on Growth Traits and Oil Yield of Medicinal Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Int J Med Arom Plants* 3(1): 33–39.
23. Huntley, A., (2009.): The health benefits of berry flavonoids for menopausal women: cardiovascular disease, cancer and cognition. *Maturitas* 63 (4), 297-301.
24. Hossain, K., Monreal, C., Sayari, A. (2008.): Adsorption of urease on PE-MCM-41 and its catalytic effect on hydrolysis of urea. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(1): 42-50.
25. Howell, A.B. (2008.): Update on health benefits of cranberry and blueberry. In IX International Vaccinium Symposium 810 (pp. 779-785).
26. Janmohammadi, M., Amanzadeh, T., Sabaghnia, N, Ion, V. (2016.): Effect of nano-silicon foliar application on safflower growth under organic and inorganic fertilizer regimes. *Botanica Lithuanica*, 22(1): 53-64.
27. Jean, R., Chiu, K., Chen, T., Chen, C., Liu, D. (2010.): Functionalized Silica Nanoparticles by Nanometallic Ag Decoration for Optical Sensing of Organic Molecule. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114 (37): 15633-15639.
28. Kato, H. (2011.): Tracking nanoparticles inside cells. *Nature Nanotechnology*, 6(3): 139-140.
29. Khanal, R.C., Howard, L.R., Wilkes, S.E., Rogers, T.J., Prior, R.L. (2012.): Effect of dietary blueberry pomace on selected metabolic factors associated with high fructose feeding in growing Sprague–Dawley rats. *Journal of medicinal food*, 15(9), 802-810.
30. Le, V.N., Rui, Y., Gui, X., Li, X., Liu, S., Han, Y. (2014.): Uptake, transport, distribution and bio-effects of SiO₂ nanoparticles in Bt-transgenic cotton. *Journal of nanobiotechnology*, 12, 1-15.
31. Liu, C., Callow, P., Rowland, L.J., Hancock, J.F. Song, G.Q. (2010.): Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern highbush blueberry cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103, 137–144.

32. Litwińczuk, W. (2013): Micropropagation of *Vaccinium* sp. by in vitro axillary shoot proliferation. In: Lambardi, M., Ozudogru, A.E. and Jain, M.S. (eds) *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 63–76.
33. Lloyd, E. and McCown, B. (1980.): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagation Society* 30, 421–427.
34. Louis, X.L., Thandapilly, S.J., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M., Aloud, B.M., Raj, P., Netticadan, T. (2014.): Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. *Food & function*, 5(8), 1785-1794.
35. Luby, J., Ballington, J., Draper, A., Pliska, K. Austin, M. (1991.): Blueberries and cranberries (*Vaccinium*), *Acta Horticulturae* 290, 393–456
36. Lyrene, P. (1978.): Blueberry callus and shoot tip culture. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 91, 171–172.
37. Lyrene, P.M. (1980.): Micropropagation of rabbiteye blueberries. *HortScience* 15, 80–81.
38. Lyrene, P., Vorsa, N., Ballington, J., (2003.): Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. *Euphytica* 133 (1), 2736.
39. Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. Kolmakov, A. (2010.): Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of The Total Environment*, 408(16): 3053-3061.
40. Mahdi, K.N.M., Petersc, R.J.B., Klumpp, E., Bohme, S., Ploeg, M.V.D., Ritsema, C. (2017.): Silver nanoparticles in soil: aqueous extraction combined with single-particle ICP-MS for detection and characterization. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manage*, 7: 24–33.
41. Majhen, I. (2020.): *Agroekonomski indikatori proizvodnje borovnice u Republici Hrvatskoj* (Doctoral dissertation, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek. Department of Bioeconomics and Rural Development).
42. Maruyama, C.R., Guilger, M., Pascoli, M., Bilesly-José, N., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F. (2016.): Nanoparticles based on chitosan as carriers for the combined herbicides imazapic and imazapyr. *Sci. Rep.*, 6:19768.

43. Martin-Ortigosa, S., Peterson, D.J., Valenstein, J.S., Lin, V.S., Trewyn, B.G., Lyznik, L.A. (2014.): Mesoporous silica nanoparticle-mediated intracellular cre protein delivery for maize genome editing via loxP site excision. *Plant Physiol.*, 164: 537–547.
44. Maurer-Jones, M.A., Gunsolus, I.L., Murphy, C.J., Haynes, C.L. (2013.): Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal. Chem*, 85: 3036–3049.
45. McLeay, Y., Barnes, M.J., Mundel, T., Hurst, S.M., Hurst, R.D., Stannard, S.R. (2012.): Effect of New Zealand blueberry consumption on recovery from eccentric exercise-induced muscle damage. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9(1), 19.
46. Michalska, A., Łysiak, G., (2015.): Bioactive compounds of blueberries: post-harvest factors influencing the nutritional value of products. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (8), 1864218663.
47. Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Farzaneh, M., Ghassempour, A. (2013.): Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 88: 48–54.
48. Murashige, T. and Skoog, F. (1962.): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497.
49. Mustafa, S.S., & Toaiema, W.E. (2022.): In vitro propagation and influence of silicon nanoparticles on growth of *Thymus serpyllum*. *Eastern Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 2(4), 17-24.
50. Nair, R., Varghese, S., Nair, B., Maekawa, T., Yoshida, Y., Kumar, D. (2010.): Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, 179(3):154-163.
51. Najafi-Ghiri, M. (2014.): Effects of zeolite and vermicompost applications on potassium release from calcareous soils. *Soil Water Res*, 9: 31–37.
52. Navratilova, J., Praetorius, A., Gondikas, A., Fabienke, W., von-der Kammer, F., Hofmann, T. (2015.): Detection of engineered copper nanoparticles in soil using single particle ICP-MS. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12: 15756–15768.
53. Neto, C.C. (2007.): Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (6), 652664
54. Nhan, L.V., Ma, C., Rui, Y., Liu, S., Li, X., Xing, B. (2015.): Phytotoxic mechanism of nanoparticles: destruction of chloroplasts and vascular bundles and alteration of nutrient absorption. *Sci. Rep.*, 5:11618.
55. Nile, S.H., Thiruvengadam, M., Wang, Y., Samynathan, R., Shariati, M.A., Rebezov, M., Kai, G. (2022.): Nano-priming as emerging seed priming technology for sustainable

- agriculture—recent developments and future perspectives. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 254.
56. Patel, S., (2014.): Blueberry as functional food and dietary supplement: the natural way to ensure holistic health. *Mediterranean J. Nutr. Metab.* 7 (2), 133-143.
 57. Pérez-de-Luque, A., Rubiales, D. (2009.): Nanotechnology for parasitic plant control, *Pest Manag. Sci.* 65: 540–545.
 58. Rades, S., Hodoroaba, V.D., Salge, T., Wirth, T., Lobera, M.P., Labrador, R.H., Unger, W.E. (2014.): High-resolution imaging with SEM/T-SEM, EDX and SAM as a combined methodical approach for morphological and elemental analyses of single engineered nanoparticles. *RSC advances*, 4(91), 49577-49587.
 59. Rafique, R., Arshad, M., Khokhar, M.F., Qazi, I.A., Hamza, A., Virk, N. (2014.): Growth response of wheat to titania nanoparticles application. *NUST J. Engin. Sci.*, 7:42–46.
 60. Rahimi, Z., Kafi, M., Nezami, A., Khozaie, H.R. (2011.): Effect of salinity and silicon on some morphophysiological characters of purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 27: 359–374.
 61. Rashwan, A.K., Osman, A.I., Karim, N., Mo, J., Chen, W. (2024.): Unveiling the mechanisms of the Development of blueberries-based Functional foods: An updated and Comprehensive Review. *Food Reviews International*, 40(7), 1913-1940.
 62. Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H., He, X., Mbarki, S., Brestic, M. (2017.): Impact of Metal and Metal Oxide Nanoparticles on Plant: A Critical Review. *Frontiers in Chemistry*, 5.
 63. Rastogi, A., Tripathi, D., Yadav, S., Chauhan, D., Živčák, M., Ghorbanpour, M., El-Sheery, N., Brestic, M. (2019.): Application of silicon nanoparticles in agriculture. *3 Biotech*, 9(3)
 64. Reed, B.M. and Abdelnour-Esquivel, A. (1991.): The use of zeatin to initiate in vitro cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience* 26, 1320–1322.
 65. Rico, C., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J., Gardea-Torresdey, J. (2011.): Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8.): 3485-3498.
 66. Rouhani, M., Samih, M.A., Kalamtari, S. (2012.): Insecticidal effect of silica and silver nanoparticles on the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus* F. (Col.: Bruchidae). *J Entomol Res*, 4:297–305.

67. Ruzic, D., Vujovic, T., Cerovic, R., Ostrolucka, M.G., Gajdosova, A. (2011.): Micropropagation in vitro of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Horticulturae* 926, 265–272.
68. Sabir, S., Arshad, M., Chaudhari, S. (2014.); Zinc Oxide Nanoparticles for Revolutionizing Agriculture: Synthesis and Applications. *The Scientific World Journal*, 1-8.
69. Sanchez-Dominguez, M., Boutonnet, M., Solans, C. (2009.): A novel approach to metal and metal oxide nanoparticle synthesis: the oil-in-water microemulsion reaction method. *J. Nanopart. Res*, 11: 1823.
70. Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S., Heber, D. (2006.): Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(25), 9329-9339.
71. Sekhon, B.S. (2014.): Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnol Sci Appl*, 7: 31.
72. Seyed Hajizadeh, H., Azizi, S., Rasouli, F., Kaya, O. (2023.): Evaluation of nano-silicon efficiency on compatible solutes and nutrient status of Damask rose affected by in vitro simulated drought stress. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1), 22.
73. Sharma, S., Gupta, S., Jain, R., Kothari, S.L., Kachhwaha, S. (2023.): SiO₂ nanoparticles as elicitor for increased rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* micropropagated in solid and liquid cultures: A comparative study. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 155(2), 541-552.
74. Singh, Y., Kumar, U., Panigrahi, S., Balyan, P., Mehla, S., Sihag, P., Dhankher, O.P. (2023.): Nanoparticles as novel elicitors in plant tissue culture applications: current status and future outlook. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108004.
75. Slomberg, D.L., Schoenfisch, M.H. (2012.): Silica nanoparticle phytotoxicity to *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Sci. Technol.*, 46: 10247–10254.
76. Song, G.Q. and Sink, K.C. (2004.): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Plant Cell Reports* 23, 475–484.
77. Teske, S.S., Detweiler, C.S. (2015.): The biomechanisms of metal and metaloxide nanoparticles' interactions with cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12: 1112–1134.

78. Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K. (2008.): Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae* 119, 72–74.
79. Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Srivastava, P.K., Singh, V.P., Singh, S. (2017.): Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, 110: 167–177.
80. Wang, Z., Xu, L., Zhao, J., Wang, X., White, J. C., Xing, B. (2016.): CuO Nanoparticle interaction with *Arabidopsis thaliana*: toxicity, parentprogeny transfer, and gene expression. *Environ. Sci. Technol.*, 50: 6008–6016.
81. Wanyika, H., Gatebe, E., Kioni, P., Tang, Z., Gao, Y. (2012.): Mesoporous Silica Nanoparticles Carrier for Urea: Potential Applications in Agrochemical Delivery Systems. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(3): 2221-2228.
82. Wolfe, D.E., Eck, P., Chin, C. (1993.): Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. *HortScience* 18, 703–705.
83. Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Meng, H., Kabehie, S., George, S., Zink, J., Nel, A. (2009.): Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs. *ACS Nano*, 3(10): 3273-3286.
84. Ziaee, M., Ganji, Z. (2016.): Insecticidal efficacy of silica nanoparticles against *Rhyzopertha dominica* F. and *Tribolium confusum* Jacquelin du Val. *J Plant Protect Res*, 56:250–256.
85. Zuverza-Mena, N., Martínez-Fernández, D., Du, W., Hernandez-Viezcas, J.A., Bonilla-Bird, N., López-Moreno, M L. (2017.): Exposure of engineered nanomaterials to plants: insights into the physiological and biochemical responses-a review. *Plant Physiol. Biochem*, 110: 236–264.

Intenetski izvori:

86. (<https://livetoplant.com/discovering-the-origin-of-blueberry-plant-a-historical-perspective/>; <https://blueberryexpert.com/articles/the-history-of-blueberries.html>)
87. <https://extension.illinois.edu/blogs/garden-scoop/2019-01-19-history-blueberries-native-american-staple-domesticated-superfood>

8. SAŽETAK

Kombinacija nanobiotehnologije s tekućim imerznim (TIB/TIS) sustavom bioreaktora nove generacije predstavlja moderan pristup koji dodatno poboljšava proces mikropropagacije biljnih vrsta *in vitro*. Istraživanje je provedeno u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS). Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje utjecaja nanočestica silicijevog dioksida ($\text{SiO}_2\text{-NP}$) na morfološke karakteristike borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro* u SETIS™ tekućem imerznom sustavu bioreaktora. Na razini pokusa nisu utvrđene statistički značajne razlike između primijenjenih tretmana nanočestica SiO_2 i kontrolne varijante u morfološkim parametrima: broj izdanaka, visina izdanka i dužina internodija. Značajne razlike utvrđene su kod tretmana s većom koncentracijom nanočestica SiO_2 (75 mg/L) ali i nižom koncentracijom nanočestica SiO_2 (30 mg/L) gdje je zabilježen veći broj listova i nodija u odnosu na kontrolu. Produktivnost ili multiplikacija po izdanku bila je značajno veća na oba tretmana s nanočesticama SiO_2 u usporedbi s kontrolnim tretmanom. Također i ostali morfološki parametri broj i visina izdanaka te dužina internodija i multiplikacija po broju izdanaka bili su veći na tretmanima sa silicijem u odnosu na kontrolu ali ne značajno. Iz naših rezultata vidljivo je da povećanje koncentracije nanočestica SiO_2 stimulatивно utječe na povećanje morfoloških parametara te parametara produktivnosti (multiplikacije). Ovi rezultati ističu vrijednost i potencijal primjene nanočestica SiO_2 u biljnoj biotehnologiji s naglaskom na poboljšanje učinkovitosti *in vitro* metoda razmnožavanja unutar tekućeg imerznog sustava bioreaktora. Daljnja istraživanja trebala bi se usmjeriti na ispitivanje većih koncentracija i razumijevanje mehanizama koji stoje iza opaženih učinaka, kao i na optimizaciju njihove primjene na raznim biljnim i voćnim vrstama.

9. SUMMARY

The combination of nanobiotechnology with next-generation temporary immersion bioreactor (TIB/TIS) systems represents a modern approach that further enhances the process of *in vitro* micropropagation of plant species. The research was conducted in the plant tissue culture laboratory of the Department of Pomology, Viticulture, and Enology (Pomology Laboratory) at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek (FAZOS). The aim of this thesis was to investigate the effects of silicon dioxide nanoparticles ($\text{SiO}_2\text{-NP}$) on the morphological characteristics of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro* within the SETIS™ temporary immersion bioreactor system. At the experimental level, no statistically significant differences were found between the applied SiO_2 nanoparticle treatments and the control variant in terms of morphological parameters: number of shoots, shoot height, and internode length. Significant differences were observed in treatments with higher concentrations of SiO_2 nanoparticles (75 mg/L), as well as with the lower concentration (30 mg/L), where an increased number of leaves and nodes was recorded compared to the control. Productivity or multiplication per shoot was significantly higher in both SiO_2 nanoparticle treatments compared to the control treatment. Additionally, other morphological parameters, such as the number and height of shoots and internode length, as well as multiplication per number of shoots, were higher in silicon treatments compared to the control, but not significantly. Our results show that increasing the concentration of SiO_2 nanoparticles has a stimulatory effect on the enhancement of morphological parameters and productivity (multiplication) parameters. These findings highlight the value and potential of SiO_2 nanoparticle application in plant biotechnology, particularly in improving the efficiency of *in vitro* propagation methods within temporary immersion bioreactor systems. Further research should focus on exploring higher concentrations and understanding the mechanisms behind the observed effects, as well as optimizing their application to various plant and fruit species.

10. POPIS TABLICA

| | |
|---|----|
| Tablica 1. Nanočestice silicija kao pesticidi..... | 11 |
| Tablica 2. Nanočestice silicija i gnojiva..... | 12 |
| Tablica 3. . Sastav korištene hranjive podloge..... | 19 |
| Tablica 4. Tretmani s korištenim koncentracijama (mg/L) u istraživanju..... | 20 |
| Tablica 5. Rezultati morfoloških parametara na kontrolnom tretmanu (K)..... | 22 |
| Tablica 6. Rezultati morfoloških parametara na tretmanu 1 (SiO ₂ -NP1)..... | 24 |
| Tablica 7. Rezultati morfoloških parametara na tretmanu 2 (SiO ₂ -NP2)..... | 26 |
| Tablica 8. Statističke razlike u broju izdanaka, visini izdanaka, broju listova, broju nodija i dužini internodija između primjenjenih tretmana..... | 28 |
| Tablica 9. Statističke razlike u multiplikaciji po izdanku i po broju izdanaka između primjenjenih tretmana u istraživanju..... | 29 |

11. POPIS SLIKA

| | |
|---|----|
| Slika 1. Vrste borovnica (<i>Vaccinium spp.</i>)..... | 3 |
| Slika 2. Shematski prikaz trajnosti svježih plodova te dostupnih prehrambenih proizvoda.... | 4 |
| Slika 3. Shematski prikaz puteva apsorpcije, metabolizma i izlučivanja antocijanina u ljudskom tijelu..... | 5 |
| Slika 4. Shematski prikaz proizvoda od borovnice i utjecaja na ljudsko zdravlje..... | 6 |
| Slika 5. Konvencionalni model (a., agar) i TIB/TIS sustav (b., bioreaktori, tekući medij) u <i>in vitro</i> kulturi borovnice na FAZOS-u..... | 8 |
| Slika 6. Primijena nanotehnologije u poljoprivredi..... | 10 |
| Slika 7. TEM fotografija nanočestice silicija NNV-001 (a i b) i vlastita ilustracija čestice pomoću umjetne inteligencije AI (c)..... | 13 |
| Slika 8. Postavljanje pokusa u laminarnoj komori <i>in vitro</i> laboratorija za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, FAZOS..... | 17 |
| Slika 9. Borovnica (<i>V. corymbosum</i> L.) u <i>in vitro</i> kulturi na FAZOS-u..... | 18 |
| Slika 10. Bioreaktorske jedinice SETIS™ i autoklaviranje komora za rast..... | 18 |
| Slika 11. Korištene nanočestice silicijevog dioksida u istraživanju..... | 20 |

12. POPIS GRAFIKONA

| | |
|---|----|
| Grafikon 1. Dinamika opadanja pH vrijednosti u istraživanju..... | 29 |
| Grafikon 2. Grafički prikaz učinka tretmana SiO ₂ -NP na morfološke parametre i pokazatelje produktivnosti multiplikacije borovnice <i>in vitro</i> | 30 |

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

UTJECAJ NANOČESTICA NA ORGANOGENEZU BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.) *IN VITRO*

Mihael Puntarić

Sažetak: Kombinacija nanobiotehnologije s tekućim imerznim (TIB/TIS) sustavom bioreaktora nove generacije predstavlja moderan pristup koji dodatno poboljšava proces mikropropagacije biljnih vrsta *in vitro*. Istraživanje je provedeno u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS). Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje utjecaja nanočestica silicijevog dioksida (SiO₂-NP) na morfološke karakteristike borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro* u SETIS™ tekućem imerznom sustavu bioreaktora. Na razini pokusa nisu utvrđene statistički značajne razlike između primijenjenih tretmana nanočestica SiO₂ i kontrolne varijante u morfološkim parametrima: broj izdanaka, visina izdanka i dužina internodija. Značajne razlike utvrđene su kod tretmana s većom koncentracijom nanočestica SiO₂ (75 mg/L) ali i nižom koncentracijom nanočestica SiO₂ (30 mg/L) gdje je zabilježen veći broj listova i nodija u odnosu na kontrolu. Produktivnost ili multiplikacija po izdanku bila je značajno veća na oba tretmana s nanočesticama SiO₂ u usporedbi s kontrolnim tretmanom. Također i ostali morfološki parametri broj i visina izdanaka te dužina internodija i multiplikacija po broju izdanaka bili su veći na tretmanima sa silicijem u odnosu na kontrolu ali ne značajno. Iz naših rezultata vidljivo je da povećanje koncentracije nanočestica SiO₂ stimulatивно utječe na povećanje morfoloških parametara te parametara produktivnosti (multiplikacije). Ovi rezultati ističu vrijednost i potencijal primjene nanočestica SiO₂ u biljnoj biotehnologiji s naglaskom na poboljšanje učinkovitosti *in vitro* metoda razmnožavanja unutar tekućeg imerznog sustava bioreaktora. Daljnja istraživanja trebala bi se usmjeriti na ispitivanje većih koncentracija i razumijevanje mehanizama koji stoje iza opaženih učinaka, kao i na optimizaciju njihove primjene na raznim biljnim i voćnim vrstama.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijeku

Mentor: dr.sc. Dejan Bošnjak

Broj stranica: 46

Broj grafikona i slika: 13

Broj tablica: 9

Broj literaturnih navoda: 85

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: borovnica, mikropropagacija, TIB/TIS sustav bioreaktora, nano SiO₂, morfološki parametri

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr.s c. 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

IMPACT OF NANOPARTICLES ON BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum* L.) ORGANOGENESIS *IN VITRO*

Mihael Puntarić

Abstract: The combination of nanobiotechnology with next-generation temporary immersion bioreactor (TIB/TIS) systems represents a modern approach that further enhances the process of *in vitro* micropropagation of plant species. The research was conducted in the plant tissue culture laboratory of the Department of Pomology, Viticulture, and Enology (Pomology Laboratory) at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek (FAZOS). The aim of this thesis was to investigate the effects of silicon dioxide nanoparticles (SiO₂-NP) on the morphological characteristics of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro* within the SETIS™ temporary immersion bioreactor system. At the experimental level, no statistically significant differences were found between the applied SiO₂ nanoparticle treatments and the control variant in terms of morphological parameters: number of shoots, shoot height, and internode length. Significant differences were observed in treatments with higher concentrations of SiO₂ nanoparticles (75 mg/L), as well as with the lower concentration (30 mg/L), where an increased number of leaves and nodes was recorded compared to the control. Productivity or multiplication per shoot was significantly higher in both SiO₂ nanoparticle treatments compared to the control treatment. Additionally, other morphological parameters, such as the number and height of shoots and internode length, as well as multiplication per number of shoots, were higher in silicon treatments compared to the control, but not significantly. Our results show that increasing the concentration of SiO₂ nanoparticles has a stimulatory effect on the enhancement of morphological parameters and productivity (multiplication) parameters. These findings highlight the value and potential of SiO₂ nanoparticle application in plant biotechnology, particularly in improving the efficiency of *in vitro* propagation methods within temporary immersion bioreactor systems. Further research should focus on exploring higher concentrations and understanding the mechanisms behind the observed effects, as well as optimizing their application to various plant and fruit species.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: dr.sc. Dejan Bošnjak

Number of pages: 46

Number of figures and pictures: 13

Number of tables: 9

Number of references: 85

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Key words: blueberry, micropropagation, TIB/TIS system, nano SiO₂, morphological parameters

Reviewers:

1. Aleksandar Stanisljević, 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 Prelog