

# Mikropropagacija ružmarina ( *Rosmarinus officinalis* L. )

---

Lovrić, Laura

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:151:646383>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**



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

Laura Lovrić

Diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**MIKROPROPAGACIJA RUŽMARINA**

*(Rosmarinus officinalis L.)*

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Laura Lovrić

Diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**MIKROPROPAGACIJA RUŽMARINA**

*(Rosmarinus officinalis L.)*

**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. Toni Kujundžić, član

**Osijek, 2024.**

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| <b>1. UVOD</b> .....   | 1  |
| <b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....   | 2  |
| 2.1. Ružmarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....   | 2  |
| 2.1.1. Komponente eteričnog ulja ružmarina.....  | 4  |
| 2.2. <i>In vitro</i> kultura biljnog tkiva – Mikropropagacija .....  | 5  |
| 2.2.1. Prednosti i nedostaci mikropropagacije .....  | 5  |
| 2.2.2. Faze u mikropropagaciji .....   | 7  |
| 2.3. <i>In vitro</i> mikropropagacija <i>R. officinalis</i> – pregled dosadašnjih istraživanja.....  | 9  |
| 2.3.1. Odabir eksplantata/tkiva .....  | 10 |
| 2.3.2. Sterilizacija/aseptičnost.....  | 10 |
| 2.3.3. Hranjivi medij/podloga .....  | 11 |
| 2.3.4. Standardi u <i>in vitro</i> kulturi tkiva ružmarina.....  | 12 |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....  | 16 |
| 3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija za kulturu tkiva.....   | 16 |
| 3.2. Biljni materijal, hranjiva podloga i tretmani u istraživanju .....  | 16 |
| 3.3. Mjerenja i obrada podataka u istraživanju .....   | 19 |
| 3.4. Obrada dobivenih podataka .....   | 20 |
| <b>4. REZULTATI</b> .....  | 21 |
| 4.1. Rezultati mjerenja promatranih morfoloških i produktivnih parametara ružmarina<br>( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) na kontrolnom tretmanu (K) .....  | 21 |
| 4.2. Rezultati mjerenja promatranih morfoloških i produktivnih parametara ružmarina<br>( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) na tretmanu s hormonima (T) ..... | 23 |
| <b>5. RASPRAVA</b> .....   | 24 |
| <b>6. ZAKLJUČAK</b> .....  | 30 |
| <b>7. LITERATURA</b> .....   | 32 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>8. SAŽETAK.....</b>                  | <b>36</b> |
| <b>9. SUMMARY .....</b>                 | <b>37</b> |
| <b>10. POPIS TABLICA.....</b>           | <b>38</b> |
| <b>11. POPIS SLIKA.....</b>             | <b>39</b> |
| <b>12. POPIS GRAFIKONA.....</b>         | <b>40</b> |
| <b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b> |           |
| <b>BASIC DOCUMENTATION CARD</b>         |           |

## 1. UVOD

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) pripada obitelji *Lamiaceae* te je tipična biljka mediteranske makije. Prepoznatljiva je po svom karakterističnom mirisu i zimzelenom izgledu grma. Vrlo je važan u kulinarstvu zbog svojih okusa i aroma. Njegovo eterično ulje ima važnu ulogu u medicini zbog svojeg antioksidativnog i antibakterijskog učinka (karnozola, kanorzne kiseline i ružmarinske kiseline). Također, koristi se u kozmetičkoj industriji i proizvodnji parfema. U svijetu postoje određeni tipovi, odnosno „kultivari“ ružmarina (namijenjeni za ekstrakciju) koji se međusobno razlikuju u zastupljenosti pojedinih komponenti eteričnih ulja.

Stoga, proizvodnja certificiranog visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog sadnog materijala postaje imperativ koji je potrebno ostvariti kako u rasadničarskom sektoru, tako i sa znanstveno – istraživačkom radu. Kultura biljnog tkiva *in vitro* (mikropropagacija) predstavlja suvremenu biotehnološku metodu kojom se u kontroliranim i aseptičnim uvjetima brzo osigurava uniformni visokokvalitetni biljni materijal. Prednost ove tehnologije očituju se u maloj količina početnog inicijalnog biljnog materijala, kontinuiranoj proizvodnji bez obzira na godišnje doba, te značajnom uštedom u prostoru i vremenu potrebnom za uzgoj biljaka.

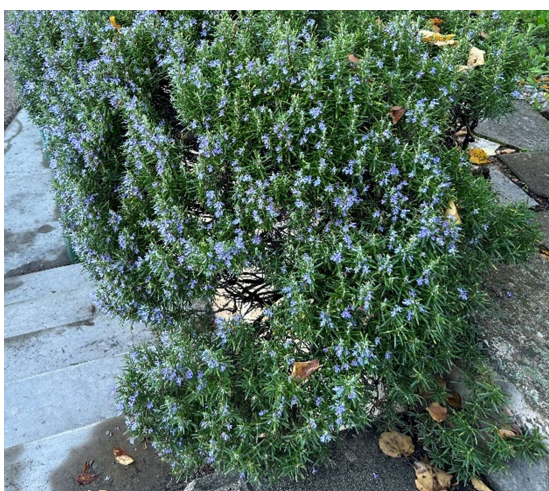
Istraživački dio ovog diplomskog rada proveden na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS) pri Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo. Cilj istraživanja usmjeren je na ispitivanje mogućnost mikropropagacije ružmarina *in vitro*, analizirajući utjecaj dva različita hranjiva medija i hormona na morfološke parametre i multiplikaciju ružmarina.

U prvom dijelu diplomskog rada opisuje se ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), uključujući porijeklo, biološku klasifikaciju, morfološke karakteristike, ljekovita svojstva te razmnožavanje isključivo tehnikom *in vitro*. Poglavlje materijali i metode detaljno opisuje postavljanje pokusa, korištene tretmane, promatrane parametre te način obrade dobivenih podataka. Na kraju rada, nakon opsežnih rezultata i rasprave, donesen je zaključak o uspješnosti pokusa i mogućnostima mikropropagacije ružmarina ovom biotehnološkom metodom.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ružmarin - *Rosmarinus officinalis* (L.), (*Salvia rosmarinus* Spenn.) pripada obitelji *Lamiaceae*, a predstavlja mirisnu višegodišnju zeljastu biljku koja se u prirodnom staništu najčešće javlja između stijena duž obale sredozemnog područja. Botanički je opisan kao uspravan, zimzeleni grm visok 1,5 do 2 m i širok oko 1 m, s bodljikavim sjajnim listićima te bijelim ili plavim cvjetovima. (Manoharachary i Nagaraju, 2016).



**Slika 1.** *Rosmarinus officinalis* L.

Povijest ružmarina seže 500 godina prije Krista, u doba starogrčko-rimske civilizacije, gdje je bio izrazito cijenjen. Prepoznat je zbog svojeg potencijala za poboljšanje pamćenja te je imao ukrasnu svrhu među znanstvenicima i akademskim aspirantima, koji su njegove grančice koristili kao ukras u kosi. U viktorijanskom razdoblju, ružmarin je bio popularan ukras tijara engleskih nevjesta kao simbol vjernosti, ljubavi i sjećanja. Ružmarin je imao važnu ulogu u kozmetičkim pripravcima Egipćana kako bi se podnijele ekstremne temperature pustinje, koje dosežu i do 45 °C.

Latinski naziv *Rosmarinus* potječe od izraza "Rosa Maris", što znači "morska rosa", ističući njegov miris koji kombinira note mente, kadulje, papra i gorkih drvenastih tonova. Ova široka paleta aroma potiče njegovu raznovrsnu upotrebu. U Etiopiji, ružmarin je poznat kao "Yetebes Ketel" ili "list za pečenje", nazivajući ga po njegovoj uobičajenoj upotrebi za začinjavanje mesa tijekom pečenja. Također je poznat pod lokalnim nazivom "Azmerino".

Usljedi raspona aroma u svijetu je vrlo cijenjen u kulinarstvu. Među brojnim kultivarima, "Tuscan Blue" - toskanski plavi ružmarin je na samom vrhu izbora vrhunskih kuhara uslijed svoje arome koja predstavlja kombinaciju limuna i bora. Zatim, "Spice Island" zbog svog okusa kombinacije klinčića i muškarnog oraščića, te ružmarin „Sissinghurst Blue“ s izraženom notom dima koji predstavlja najbolji izbor za jela s roštilja.

Karnozinska kiselina i karnozin koji se nalaze u ovoj biljci imaju antibakterijski učinak (Jordán i sur., 2012.). Dostupne informacije upućuju kako su diterpeni vrlo obećavajući antivirusni i antimikrobni spojevi u liječenju trenutnih ili budućih zaraznih bolesti kao što je COVID-19. Glavni problem za kliničku primjenu ovih spojeva je vrlo skupi proces dobivanja ovih spojeva iz prirodnih izvora. U cilju rješavanja ove problematike *in vitro* tehnika kulture biljnog tkiva i stanica na ružmarinu predstavlja vrlo učinkovitu alternativu za dobivanje ovih spojeva (sekundarnih metabolita) visoke kvalitete i kvantiteta. Slijedom navedenog, TIS/TIB sustavi (sustav bioreaktora s povremenom imerzijom, imerzni bioreaktori) predstavljaju sustave od velikog interesa za proizvodnju sekundarnih metabolita. Tekući medija u TIB-u omogućuje privremeni kontakt biljnog tkiva i opskrbu biljaka hranjivim tvarima ali i prijenos plinova te smanjenje fizioloških poremećaja za vrijeme kulture.

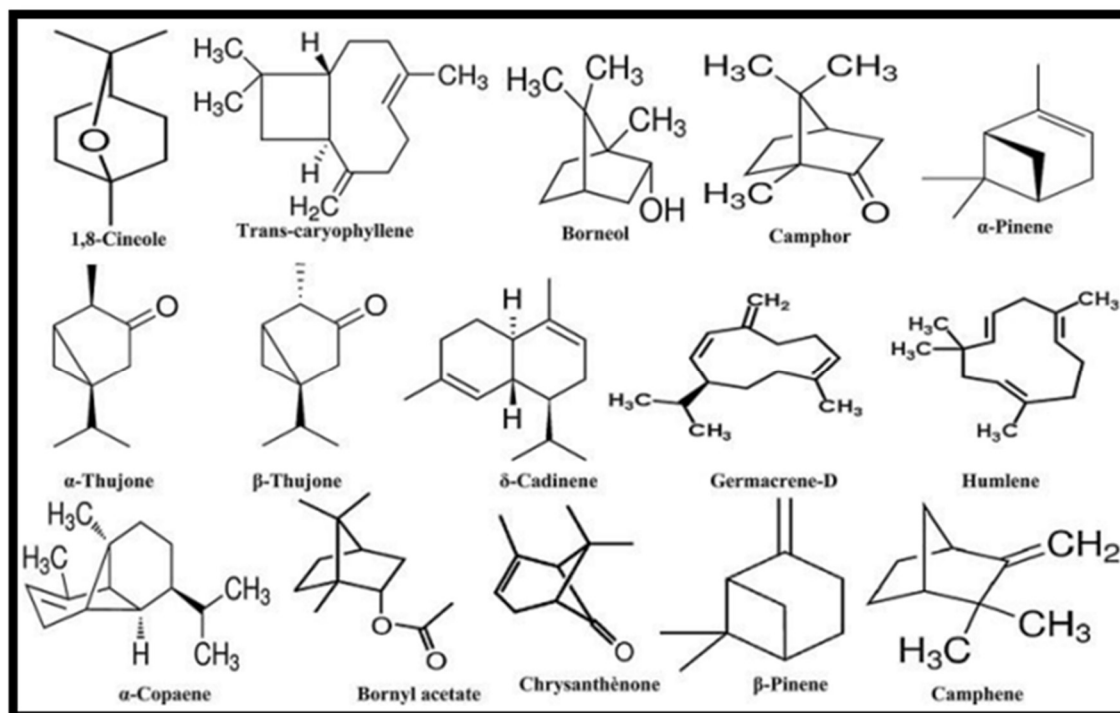
Hranjivi medij koji se koristi u *in vitro* proizvodnji jedan je od najkritičnijih čimbenika uspjeha *in vitro* razmnožavanja. Suplementacija hormona je ključna za regulaciju rasta i razvoja. Posebno je bitna primjena biljnih hormona koji reguliraju rast i razvoj biljaka. Od korištenih hormona rasta najčešće se koriste citokinini i auksini. Među citokininima, 6-benzilaminopurin (6-BAP) je najčešće korišten - regulira diobu stanica u biljnim izdancima. 1-naftalenoctena kiselina (NAA) predstavlja auksin te igra temeljnu ulogu u razvoju biljaka. Kombinacija ova dva hormona je među najčešće primjenjivanim jer njihova interakcija često pogoduje najoptimalnijem rastu i razvoju biljaka *in vitro* (Skalicky i sur., 2018.). Autori Darwesh i Alayafi (2018.) primjenom 6-BAP-om u koncentraciji od 3 mg/L<sup>-1</sup> dobili su visoke koncentracije fenolnih spojeva (10,45 mg/g<sup>-1</sup>) u *in vitro* kulturi *R. officinalis*. Caruso i sur. (2000.) potvrdili su prisutnost karnozinske kiseline u regeneriranim izdancima ružmarina uzgojenim na hranjivoj podlozi s dodatkom hormona zeatina i indoloctene kiseline. Pérez-Mendoza i sur. (2020.) istraživali su mogućnost produkcije karnozinske kiseline i karnozina u kalusu ružmarina uzgojenom na mediju s dodatkom hormona 2,4-diklorfenoksiectene kiseline (2,4-D) i 6-BAP-a.



### 2.1.1. Komponente eteričnog ulja ružmarina

Zahvaljujući svojim etnobiološkim svojstvima, ružmarin je postao osnovna biljka raznovrsnih terapija. *R. officinalis* „Collingwood Ingram“ i „Blue Spires“ poznati po svom intenzivnom mirisu (Begum i sur., 2013.) predstavljaju osnovu u aromaterapiji. Kožnati listovi biljke poznati su po sadržaju hlapljivog ulja na labiatnim trihomima, a sama produkcija ulja veća je tijekom ljeta u odnosu na zimu (Tawik i sur., 1998.). Kolosalni sastojci eteričnog ulja ružmarina uključuju: kamfor (5 - 31 %), 1,8-cineol (15 - 55 %), pinen (9 - 26 %), borneol (1,5 - 5,0 %), kamfen (2,5 - 12,0 %), pinen (2,0 - 9,0 %), limonen (1,5 - 5,0 %), verbenon (2,2 - 11,1 %), kariofilen (1,8 - 5,1 %) i mirceen (0,9 - 4,5 %).

Bioaktivne molekule prisutne u ružmarinu obuhvaćaju monoterpene (alfa-pinen, beta-pinen, kamfen, mikren, alfa-felandren, limonen, alfa- i gama-terpinen, paracimen), seskviterpen (beta-kariofilen), diterpene (karnozna kiselina, karnosol, rosmarol, epirosmanol, izorosmanol i rosmaridifenol), triterpene (oleanska kiselina, ursolna kiselina, betulin, alfa-amirin i beta-amirin) te fenolne kiseline (kafeinska, klorogenska i rosmarinska kiselina) i flavonoide (Begum i sur., 2013; González - Minero i sur., 2020). Sve navedene komponente naglašavaju njegovu važnost u proizvodnji parfema, medicini i konzerviranja hrane (Slika 2).



Slika 2. Komponente eteričnog ulja ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), (Izvor: Selvaraj i sur., 2022.)

## **2.2. *In vitro* kultura biljnog tkiva – Mikropropagacija**

Biotehnologija u biljnoj proizvodnji predstavlja jedno od najznačajnijih dostignuća znanosti i tehnologije XX. stoljeća, te ima izrazitu ulogu u razvoju moderne poljoprivrede i hortikulture. Kultura biljnog tkiva ili mikropropagacija je grana biotehnologije u biljnoj proizvodnji koja predstavlja skup metoda ili tehnika razmnožavanja biljaka putem *in vitro* kultura (kulture u staklu, *lat.* *in vitro* = u staklu) biljnih stanica, tkiva i organa. Uporabom ove tehnike omogućuje se znatno povećanje učinkovitosti razmnožavanja biljnih vrsta, ali i mogućnost eliminacije biljnih patogena iz biljnog tkiva. Mikropropagacija ima golem potencijal u očuvanju biološke raznolikosti; *in vitro* kulturom mogu se razmnožavati mnoge rijetke, zaštićene te primjerice endemske vrste *Dianthus* (Cristea, 2010.) kao i rijetke vrste i kultivari kultiviranih biljaka koje se manje koriste te se nalaze na rubu izumiranja. Mikropropagacija također ima veliki značaj u oplemenjivanju biljaka, a *in vitro* kulture su nezamjenjive u biljnom genetskom inženjeringu (GMO).

Razvoj učinkovitih protokola za mikro - razmnožavanje biljnih vrsta, posebice biljnih vrsta koje je teško razmnožavati klasičnim načinima, može pomoći razvoju hrvatskog rasadničkog sektora za proizvodnju sadnog materijala prema europskim standardima.

### **2.2.1. Prednosti i nedostaci mikropropagacije**

Važnost mikropropagacije i njene prednosti u usporedbi s klasičnim vegetativnim razmnožavanjem (Cachiță-Cosma, 1987; Stănică i sur., 2002):

- Mogućnost dobivanja biljaka bez patogena, virus-free biljke iz kulture meristema;
- Masovna produktivnost, velike stopa umnožavanja, geometrijska progresija u nekoliko ciklusa godišnje;
- Uloga u oplemenjivačkom radu, mogućnost brzog i masovnog razmnožavanja potencijalno vrijednih selekcija biljnih vrsta i kultivara;
- Dinamika proizvodnje ne ovisi o godišnjem dobu i vremenu, kontrolirani i zaštićeni prostori, laboratoriji, klima komore, staklenici i plastenici;
- Potreba za manjom proizvodnom površinom, ušteda u prostoru (klima komore, police, laboratorij);
- Mogućnost očuvanja vrijednih genotipova u malim prostorima;

- Jednostavniji transport veće količine germplazme neovisno o fitosanitarnoj karanteni;
- Učinkovitije razmnožavanje pojedinih biljnih vrsta kod kojih je razmnožavanje tradicionalnim metodama teško i neekonomično;
- Mogućnost očuvanja i razmnožavanje rijetkih i endemičnih biljnih vrsta.

Mikropropagacija također ima neke nedostatke:

- Složenija je i sofisticiranija od tradicionalnih klasičnih metoda te zahtijeva posebnu obuku;
- Početni troškovi uspostave laboratorija ili ustanove za mikropropagaciju su relativno visoki;
- Potrebna je specijalna, odnosno posebna laboratorijska oprema, kao i skupe te vrlo čiste kemikalije;
- Postoji opasnost od zasićenja tržišta biljnim vrstama i kultivarima koji su u danom trenutku atraktivni i moderni ili koje je lako razmnožiti *in vitro*, na štetu drugih biljnih vrsta i kultivara.

Osim navedenog, mikropropagacija ima sve prednosti i nedostatke sadnog materijala uzgojenog u kontejnerima, jer su u velikoj većini biljke dobivene mikropropagacijom kontejnirane sadnice. Glavne prednosti (Stānicā i sur., 2002.):

- Daljnje operacije omogućuju uporabu standardizirane mehanizacije;
- Lakša je manipulacija u odnosu na biljke uzgojene u tlu ili na polju, nema vađenja iz tla u slučaju presađivanja ili prodaje;
- Biljke uzgojene u kontejnerima mogu se transportirati, prodavati, isporučivati i saditi tijekom cijele godine s izuzetkom u vrlo hladnim ili vrlo toplim periodima;
- Bolja iskorištenost prostora zbog vrlo velike gustoće biljaka po jedinici površine;
- Korijenje biljaka uzgojenih u kontejnerima je bolje razvijeno, formira gustu mrežu isprepletenu u kugli supstrata kontejnera, što ujedno osigurava vrlo visok postotak preživljavanja, blizu 100 %;
- Otklanja se potreba za stratifikacijom ili skladištenjem u posebnim uvjetima.

### 2.2.2. Faze u mikropropagaciji

Profesor Murashige sa Sveučilišta Kalifornija (Riverside) definirao je tri koraka ili faze (I-III) u *in vitro* razmnožavanju biljaka (Murashige, 1974.). Te faze su naširoko prihvaćene od strane istraživačkih ali i komercijalnih laboratorija za kulturu biljnog tkiva jer ne samo da opisuju proceduralne korake u procesu mikropropagacije, već predstavljaju ključne točke na kojima je potrebno promijeniti uvjete uzgoja i okoliša.

Pojedini istraživači predložili da se obrada i priprema matičnih biljaka treba promatrati kao zasebna faza. Prijedlog je usvojen prema Debergha i Maenea (1981.) koji iznose da se takvi pripremni postupci trebaju nazvati nultom fazom (faza 0), a također tada je prepoznata i četvrta faza (IV), u kojoj se biljke prenose u vanjski okoliš (*ex vitro*). U nastavku iznosimo opis faza 0 – IV:

#### *Faza 0: Odabir i priprema matične biljke*

Prije početka mikropropagacije posebnu pozornost treba posvetiti odabiru matičnih biljaka. Biljke moraju biti tipične za kultivar ili vrstu te bez ikakvih simptoma bolesti. Može biti korisno tretirati zaštitnim sredstvima odabrane biljke (ili njezine dijelove) kako bi kultura *in vitro* bila što uspješnija. Smanjenje razine kontaminacije eksplantata Debergh i Maene (1981.) smatraju vrlo važnim, a ista predstavlja zasebnu fazu u komercijalnom programu mikropropagacije. Rast, morfogeneza i stope razmnožavanja *in vitro* mogu se poboljšati odgovarajućom prethodnom okolišnom i kemijskom obradom matičnih biljaka.

Također moguća je i potreba za postupcima za otkrivanje i smanjenje ili uklanjanje sistemskih (endo) bakterijskih i virusnih bolesti. Indeksiranje i eliminacija bolesti trebala bi biti sastavni dio cjelokupnog rada mikropropagacije; ali te se mjere opreza nažalost često izostavljaju, ponekad s nepovratnim posljedicama. Dakle, prikladno je uključiti sve postupke koji su usvojeni u biljnoj selekciji i predtretmane unutar „Faze 0”.

#### *Faza I: Uspostava aseptične kulture*

Drugi korak u procesu mikropropagacije je dobivanje aseptične kulture odabranog biljnog materijala. Uspjeh ove faze prvenstveno ovisi o prijenosu eksplantata u kulturu, bez vidljivih mikrobnih kontaminanata; te da nakon toga uslijedi porast (npr. rast vrha izdanka ili stvaranje kalusa). Obično se serija eksplantata prenosi u kulturu u isto vrijeme. Nakon kratkog razdoblja inkubacije, svaki kontejner (posuda, epruveta) za koji se utvrdi da sadrži kontaminirane eksplantate ili medij se uklanja. Faza I se smatra zadovoljavajućom, odnosno

dovršenom kada je odgovarajući broj eksplantata preživio bez znakova kontaminacije te nastavio s rastom. Cilj je reproduktivnost, a ne 100 % uspjeh.

#### *Faza II: Proizvodnja odgovarajućeg broja biljaka*

Cilj faze II je proizvesti dovoljan broj novih mikrobiljaka koje su kada se odvoje od inicijalne kulture sposobne razviti cjelovitu biljku. Prema *in vitro* postupku, razmnožavanje se može izvesti iz novoproducedeni aksilarnih (lateralnih ili pazušnih) te adventivnih izdanaka, somatskih embrija ili drugih propagativnih organa. Neke od mikrobiljaka proizvedenih u fazi II (osobito izdanci) također se mogu koristiti kao osnova za daljnji ciklus razmnožavanja kako bi se povećao njihov broj.

#### *Faza III: Priprema za rast u prirodnom ex vitro okruženju*

Izdanci ili biljčice dobivene u fazi II su male i još uvijek nisu sposobne samostalno rasti u tlu ili supstratu. U fazi III poduzimaju se koraci za uzgoj pojedinačnih ili skupina biljčica, sposobnih za provođenje fotosinteze i preživljavanje bez umjetne opskrbe ugljikohidratima. Nekim biljčicama potrebno je posvetiti posebnu pažnju u ovoj fazi kako ne bi zakržljale ili ušle u dormancu kada se izvade iz *in vitro* uvjeta. Kao što je izvorno predložio Murashige, faza III uključuje *in vitro* ukorjenjivanje (rizogenezu) izdanaka prije njihovog prijenosa u tlo.

Ukorjenjivanje ili rizogeneza izdanaka vrlo je važan dio svake *in vitro* sheme razmnožavanja. Pojedine vrste u fazi III prirodno stvaraju adventivno korijenje na izdancima tijekom kulture, ali obično je potrebno primijeniti posebni hranjivi medij ili metodu za poticanje stvaranja korijena (rizogenezu). Ponekad se izdanci trebaju naknadno izdužiti prije ukorjenjivanja. Kako bi se smanjili troškovi mikrorazmnožavanja, mnogi laboratoriji uklanjaju neukorijenjene izdanke iz *in vitro* uvjeta i ukorjenjuju ih direktno izvan posude s kulturom u *ex vitro* uvjete.

#### *Faza IV – transfer u ex vitro okruženje*

Iako Murashige nije dao posebnu numeriranu oznaku fazi metode kojom se biljčice prenose iz *in vitro* u *ex vitro* uvjete ona je iznimno važna. Ako se ne provedi pažljivo, prijenos može dovesti do značajnog gubitka biljnog materijala za razmnožavanje. Dva su glavna razloga:

1. Izdanci razvijeni u kulturi često su proizvedeni pri visokoj relativnoj vlažnosti i slabijem 'intenzitetu' svjetlosti. Što rezultira manjom produkcijom epikutikularnog voska ili voska s promijenjenim kemijskim sastavom nego na biljkama uzgojenim

klasičnim načinom. Kod nekih *in vitro* biljaka puči na listovima mogu biti atipične i nesposobne se zatvoriti u uvjetima niske relativne vlažnosti. Biljke uzgojene u kulturi tkiva stoga brzo gube vodu kada se presele u vanjske *ex vitro* uvjete (Sutter i Langhans, 1979., 1980.).

2. *In vitro* biljke opskrbljene su saharozom (ili nekim drugim ugljikohidratom) u hranjivom mediju te se održavaju u uvjetima slabijeg osvjetljenja, stoga nisu u potpunosti ovisne o vlastitoj fotosintezi (miksotrofne su, heterotrofne). Potreban je poticaj koji nije osiguran u zatvorenom *in vitro* okruženju kako bi se promijenile i u potpunosti osposobile za vlastitu proizvodnju ugljikohidrata tj. prelazak na fotoautotrofnu ishranu (Marin i Gella , 1987). Promjena se događa tek nakon što biljke provedu nekoliko dana u *ex vitro* uvjetima.

U praksi se biljčice vade iz kontejnera proizišlog iz Faze III, a ukoliko su rasle na hranjivoj podlozi s agarom, gel ili agar se pažljivo ispiru s korijenja. U ovoj se fazi preporuča se i nanošenje Anti transpiracijskog filma na listove, no ono se u praksi rijetko provodi. Biljčice se zatim presađuju u odgovarajući medij za ukorjenjivanje (kao što je supstrat s kombinacijom treseta i pijeska) te drže nekoliko dana u uvjetima visoke relativne vlažnosti i smanjenog intenziteta svjetla (mrežarnik, zasjena). Maglica u obliku vodene pare vrlo je učinkovita za održavanje vlažnosti (misteri, orošivač). Vlaženje zamagljivanjem može biti automatski ili se biljčice mogu staviti pod prozirni plastični pokrov i zamagljivati ručno. Kod nekih *in vitro* biljaka moguće je izostaviti fazu III; izdanci iz faze II ukorjenjuju se izravno pri visokoj vlažnosti i u isto vrijeme očvršćuju na vanjske uvjete.

### **2.3. *In vitro* mikropropagacija *R. officinalis* – pregled dosadašnjih istraživanja**

U ovom dijelu detaljno iznesen je pregled pojedinih dosadašnjih istraživanja vezanih za kulturu biljnog tkiva ružmarina. Većinom se ispituje utjecaj pojedinih hranjivih medija i biljnih hormona na produktivnost i razvoj tipova eksplantata te sadržaj pojedinih eteričnih ulja u biljci i/ili kalusu (Tablica 1.).

Primjenom tehnike *in vitro* razmnožavanja moguće je masovno proizvesti kvalitetan komercijalni sadni biljni materijal, te istom tehnikom očuvati rijetke i/ili ugroženih vrste

ljekovitog, odnosno aromatičnog bilja (Grigoriadou i Krigas i sur., 2019.) Sam protokol *in vitro* tehnike po Murashige-u podrazumijeva pravilnu provedbu svih ključnih faza u mikropropagaciji: izbor matičnih biljaka (ishodišni/inicijalni materijal), pripremu sterilnih eksplantata i hranjivog medija, umnožavanje/multiplikaciju, ukorjenjivanje/rizogenezu te završnu fazu aklimatizacije na *ex vitro* uvjete.

### **2.3.1. Odabir eksplantata/tkiva**

Misra i Chaturvedi (1983.) u svom istraživanju ističu da su biljke nastale iz nodijalnih segmenata pokazale bolji rast i prilagodbu na poljske *ex vitro* uvjete u odnosu na eksplantate dobivene iz vršnih izdanaka. Nadalje, indukcija aksilarnih (lateralnih) izdanaka postignuta je u roku od 25 do 30 dana na 10 % zeljastih nodijalnih segmenata kultiviranih na WPM mediju. Isti autori navode da je moguće proizvesti do novih 5000 biljaka tijekom jedne godine samo iz jednog uspješnog nodijalnog eksplantata.

Mascarello i sur. (2017) istraživali su različite metode promocije i indukcije kalusa iz eksplantata lišća uzetih s biljaka uzgojenih na otvorenom polju, kao i apikalnih i nodijalnih eksplantata s polja i iz staklenika. Apikalni i nodijalni eksplantati rezultirali su većim mortalitetom. Husain i Jawad (2019.) ističu jači utjecaj apikalnog meristema (62,2 %) u odnosu na lateralni (42,5 %) u fazi inicijacije biljnog materijala.

### **2.3.2. Sterilizacija/aseptičnost**

Masoody i sur., (2015.) proveli su pokus s etanolom, živa kloridom i natrijevim hipokloritom. Autori su utvrdili da je najučinkovitija sterilizacija eksplantata postignuta nakon dva tjedna kulture kod tretmana s natrijevim hipokloritom (NaOCl) u koncentraciji od 0,75 % / 15 minuta. Također, tretmani živinim kloridom u koncentraciji od 0,06 mg/l / 6 minuta te etanolom u koncentraciji od 50 % / 3 minute rezultirali su velikim brojem zdravih listova. Masoody i Florin (2015.) su iznijeli da je postignut najveći broj sterilnih vršnih (apikalnih) pupova (3,24) na tretmanu sa 70 % etanola / 30 sekundi te NaOCl / 20 min. Nadalje, Sakr i sur., (2018.) su istraživali utjecaj dvostruke sterilizacije NaOCl-om, a zatim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kombinaciji s limunovim sokom (koncentracija 5/100 V/V) na eksplantatima

ružmarina. Ovaj tretman pozitivno je utjecao na povećanje postotka uspješnosti sterilizacije u odnosu na tretman srebrom nitratom ( $\text{AgNO}_3$ ).

### 2.3.3. Hranjivi medij/podloga

Misra i Chaturvedi (1983.) iznose da je citokinin 6-benzilaminopurin (BAP) u usporedbi s kinetinom (KN) pokazao veću učinkovitost u indukciji novih izdanaka. Najveći broj formiranih izdanaka po eksplantatu (nakon 30 dana) dobiven je na tretmanu s 0,2 mg/l BAP-a, dok je indukcija korijena (rizogeneza) od 80 % uspješnosti zabilježena na tretmanu s 0,25 mg/l indol 3 propionske kiseline (IPA, auksin). Leelavathi i Narendra (2013.) opažaju da bazni medij Murashige i Skoog, (1962.) - MSBM u kombinaciji s BAP-om (8,88  $\mu\text{M}$ ) i indol 3 octenom kiselinom - IAA (2,85  $\mu\text{M}$ ) predstavlja najprikladniji medij za inicijaciju te indukciju velikog broja izdanaka proizišlih iz vršnih (apikalnih) pupoljaka *R. officinalis*. Prijenosom dobivenih akseničnih biljaka na kaljenje u polje dobiven je postotak preživljavanja od 80 %.

Masoody i Florin (2015.) ispitivali su utjecaj regulatora rasta *in vitro* na formiranje kalusa iz apikalnih pupova. Prema toj studiji, optimalna kombinacija BAP-a i 1 naftil octene kiseline - NAA pri koncentracijama od 2,0 odnosno 1,5 mg/l rezultirala je najvećom produkcijom kalusa (volumena 10,2  $\text{mm}^3$ ) na MS hranjivom mediju. Najbolja poboljšanja postignuta su u rasponu koncentracija od 2,0 mg/l BAP-a i 2,0 mg/l NAA. Masoody i Florin (2015.) opisuju utjecaj BAP-a i NAA na eksplantate mladih listova (uzgojenih u posudama) u kulturi kalusa (indukcija kalusa). Pri koncentraciji od 1,5 mg/l BAP i 1,5 mg/l NAA, boja iniciranog kalusa promijenila se iz bijele u smeđu, dok su koncentracije 2,0 i 3,0 mg/l BAP-a rezultirale promijenili kalus iz svijetlosmeđe u smeđu boju. Maksimalni volumen kalusa (14,4  $\text{mm}^3$ ) postignut je pri koncentraciji od 1,5 mg/l BAP i 1,5 mg/l NAA, dok je minimalni volumen (0,9  $\text{mm}^3$ ) postignut pri 0,5 mg/l BAP-a. Veličina kalusa značajno su se smanjila kada su koncentracije NAA povećane na 2,0 mg/l ili više, što sugerira da se s povećavanjem koncentracije NAA smanjuje razvoj kalusa. Autori smatraju da je koncentracija od 1,5 mg/l BAP-a i 1,5 mg/l NAA najučinkovitija za indukciju čisto bijele kulture kalusa s volumenom od 14,4  $\text{mm}^3$ . Nakon 45 dana kulture, najveća somatska embriogeneza biljaka ružmarina postignuta je na MS mediju s benefitnim učinkom u koncentraciji od 2 mg. Vasile i sur., (2015.) istraživali su mogućnosti multiplikacije apikalnog tkiva ružmarina s niskim koncentracijama fitohormona. Autori preporučuju medij s niskim balansom hormona u



kombinaciji s 0,2 mg/l BAP-a + 0,3 mg/l IAA (45 dana), koji je rezultirao najvećom multiplikacijom. Za regeneraciju kalusa preporučene su veće koncentracije auksina (8 - 10 mg/l 2,4 D) i citokinina. Mascarello i sur. (2017.) istraživali su postotak ukorjenjivanja na mediju bez regulatora rasta i na mediju s IAA (0,5 i 1 mg/l), iznoseći veći postotak ukorjenjivanja na tretmanima s 0,5 mg/l IAA (75% i 78,6%) u odnosu na 1 mg/l. Također, navode mogućnost ukorjenjivanja na mediju bez regulatora rasta u stopi od 50 %. Sakr i sur., (2018.) su istaknuli da su fenilurea - CPPU i tidiazuron - TDZ najučinkovitiji regulatori rasta (PGR) u formiranju izdanaka i embrija, ali pri nižim koncentracijama u odnosu na iste koncentracije BAP-a. Ovo istraživanje je u kontradikciji s navodima Leelavathija i Kuppana (2013.) koji preporučuju MSBM + BAP (8,88  $\mu$ M) + IAA (5,70  $\mu$ M) kao optimalni medij za indukciju i rast bjelkasto-zelenog kompaktnog kalusa iz apikalnog eksplantata. Leelavathi i sur., (2013.) također navode pojavu izdanaka s 1 - 2 listića na svim primijenjenim koncentracijama regulatora rasta u različitim postocima: MSBM + BAP (8,88  $\mu$ L) + IAA (2,85  $\mu$ L) i MSBM + KN (13,92  $\mu$ ) + IAA (2,85  $\mu$ L). Nesrazmjernosti bi mogle promijeniti upotrebu veće koncentracije BAP-a individualno ili u odgovarajućoj kombinaciji s auksinima. Masoody i Florin Stanica (2015.) navode da je kombinacija BAP-a i NAA značajno utjecala na suhu i svježiu masu kalusa. Sakr i sur., (2018.) spominju učinkovitu inicijaciju korijena (rizogenezu) na MS mediju bez hormona za neke sorte ružmarina, dok se MS medij koji sadržava NAA i pola koncentracije MS elemenata smatra najboljim za ukorjenjivanje izdanaka u odnosu na IAA i MS medij (tanji i kraći korjenčići).

#### **2.3.4. Standardi u in vitro kulturi tkiva ružmarina**

Standardni protokol brze klonske *in vitro* multiplikacije aksilarnih pupoljaka *R. officinalis* uključuje MS podlogu koja sadrži BAP (8,88  $\mu$ M) i IAA (2,85  $\mu$ M), Leelavathi i sur., (2013). Faza ukorjenjivanja nakon 28 dana kulture uključuje upotrebu MSBM medija i BAP-a (8,88  $\mu$ L) + NAA (2,68  $\mu$ L) + IBA (4,92  $\mu$ L). Ulaskom u posljednju fazu mikropropagacije, aklimatizirane biljke potvrđuju učestalost preživljavanja od 75 % nakon prenošenja u tlo. Mascarello i sur., (2017.) istraživali su klasični protokol mikropropagacije i čimbenike koji potiču indukciju kalusa. Autori navode bolju mogućnost upotrebu lišća kao eksplantata s majčinskih biljaka *R. officinalis* uzgajanih na otvorenom polju u odnosu na upotrebu apikalnih i internodijalnih eksplantata koji su rezultirali visokim udjelom mortaliteta. Nakon 2 mjeseca kulture (pojava kalusa), kalusi su subkultivirani u isti medij te su kroz četiri tjedna

povećali svoju biomasu. Prebacivanje na tekući medij s istom koncentracijom regulatora rasta u cilju većeg stvaranja biomase *in vitro*. Ukorjenjivanje od 50 % pojavilo se i na mediju bez regulatora rasta, dok je veći postotak ukorjenjivanja dobiven u mediju koji je sadržavao IAA (75 i 78,6) pri koncentraciji od 0,5, odnosno 1 mg/l. U zaštićenim uvjetima, 1 mg/l IAA proizveo je najveći udio (64 %) ukorijenjenih sadnica.

**Tablica 1.** Tablični pregled *in vitro* istraživanja na ružmarinu *R. officinalis* L. (Izvor: Selvaraj i sur., 2022.).

| Br. | Vrsta eksplantata  | Hranjivi medij   | Zaključak  | Literatura                   |
|-----|--------------------|--|--|------------------------------|
| 1.  | Nodijalni segmenti | MS + 0,2 mg <sup>l</sup> -1 BAP + 0,25 mg <sup>l</sup> -1 IPA  | 80 % uspješnog ukorjenjivanja  | Misra i Chaturvedi (1984)    |
| 2.  | Adventivni izdanci | MS + 1 mg <sup>l</sup> -1 BAP + 2 Mm prolina   | Razvijene su elitne klonске linije   | Ronghui, i sur. (2009)       |
| 3.  | Apikalni pupovi    | MSBM + BAP (8,88 μM) + IAA (2,85 μM)   | 80 % preživljavanja  | Leelavathi i Kuppan, (2013.) |
| 4.  | Aksilarni pupovi   | MSBM + BAP (8,88 μM) + IAA (2,85 μM); MSBM + BAP (8,88 μl) + NAA (2,68 μl) + IBA (4,92 μl)   | 75 % preživljavanja  | Leelavathi, i sur. (2013)    |
| 5.  | Listovi            | MS + 2,0 mg <sup>l</sup> -1 BAP + 1,5 mg <sup>l</sup> -1 NAA   | Najveći volumen kalusa (mm <sup>3</sup> ) te svježja i suha masa kalusa            | Al Masoody, i sur. (2015)    |
| 6.  | Apikalni pupovi    | MS + 2,0 mg <sup>l</sup> -1 BAP + 2,0 mg <sup>l</sup> -1 NAA   | Utjecaj na svježju i suhu masu kalusa (g)  | Al Masoody i Florin (2015)   |
| 7.  | Mladi listovi      | MS + 1,5 mg <sup>l</sup> -1 BAP + 1,5 mg <sup>l</sup> -1 NAA; MS + 2,0 mg <sup>l</sup> -1 BAP + 1,5 mg <sup>l</sup> -1 NAA   | Pozitivan porast broja somatskih embrija nakon 45 dana                             | Al Masoody i Florin (2015)   |
| 8.  | Vrhovi             | MS + 0,2 mg/l BA + 0,3 mg/l AIAMS + 8,0 mg/l 2,4D  | Multiplikacija na mediju s niskim koncentracijama fitohormona                      | Laslo Vasile, i sur. (2015)  |
| 9.  | Izdanci            | MS + BAP 1,0 mg/l + NAA 0,125 mg/l   | Najveća indukcija i rast kalusa  | El-Zefzafy i sur. (2016)     |
| 10. | Listovi            | Mediji bez regulatora rasta<br>Mediji + regulator rasta (IAA)  | Najveći postotak aklimatizacije (64%)  | Mascarello, i sur. (2017)    |
| 11. | Listovi            | MS medij + 1 mg/l CPPU; WPM + 1 mg/l CPPU  | Najveći srednji broj proizvedenih izdanaka bio je 2,40 izdanaka/eksplantata        | Salwa, i sur. (2018)         |
| 12. | Sjemenke           | MS + modificirana koncentracija regulatora rasta:<br>5,0 mg/l Kinetin.<br>3 mg/l BAP + kokosovo mlijeko 5 ml/l.<br>BAP 3,0 mg/l.<br>Kokosova voda 5,0 ml/l + Kinetin 3,0 mg/l. | Najveći broj izdanaka/eksplantata  | Darwesh i Aisha (2018)       |
| 13. | Izdanci            | MS + BAP 1 mg/l <sup>-1</sup> + NAA 0,1 mg/l <sup>-1</sup> (MS I)<br>MS + BAP 2 mg/l <sup>-1</sup> + NAA 0,1 mg/l <sup>-1</sup> (MS II)  | Utvrđeno je da se gustoća trihoma povećala tri puta u usporedbi s <i>in vivo</i> . | Valbona Sota i sur. (2019)   |

Darwesh i Alayafi (2018.) evaluirali su pokušaj indukcije izdanaka sa sterilnih sadnica uzgojenih iz sjemena *R. officinalis* na MS mediju. Prenosili su presadnice na modificirani MS medij sa sintetskim abiotskim (Kinetin i BAP) i prirodnim biotskim tvarima (kokosova voda). Najveći broj i veličina izdanaka te sadržaj fenola u listovima dobiveni su pri kombinacijama i koncentracijama 3,0 mg/l BAP + 5,0 ml/l kokosa vode i 5,0 mg/l kinetina, dok je najveći sadržaj antocijanina postignut na tretmanu s kinetinom u koncentraciji s 3,0 mg/l + kokosova voda 5,0 mg/l.

El-Zefzafy i sur. (2016.) proučavali su fiziološki i fitokemijski odgovor ružmarina *in vitro* na indukciju i proizvodne parametre kalusa (veličina, svježina i suha tvar) upotrebom auksina (IAA ili NAA) i citokinina (BAP ili TDZ). Najveća indukcija i rasta kalusa primijećena je pri aplikaciji NAA 0,125 mg/l + BAP 1,0 mg/l, što je u suglasnosti s rezultatima Masoody i Stanica (2013.), koji iznose da je kombinacija BAP i NAA značajno utjecala na rast kalusa ružmarina (volumen, svježina i suha tvar). Utjecaj auksina (IAA ili NAA) i citokinina (BAP ili TDZ) na ukupne hidrokscinamičke derivate, poput ružmarinske kiseline u kalusu *R. officinalis*, ukazuje da predložena MS hranjiva podloga s dodatkom NAA i BAP, ima pozitivan učinak na nakupljanje ružmarinske kiseline. Međutim, u usporedbi s vršnim eksplantatima (kontrolom), utjecaj BAP-a pri koncentracijama 0,5 i 1,0 mg/l bio je vrlo izražen. Najveća produkcija ružmarinske kiseline (0,487 % suhe mase) zabilježena je pri tretmanu s NAA 0,125 mg/l + BAP 0,50 mg/l, koja je rezultirala neznatno većom koncentracijom od one u samoj biljci, što nam ukazuje kako regulatori rasta nisu imali značajni utjecaj na proizvodnju ružmarinske kiseline (El-Zefzafy i sur., 2016.). El-Zefzafy i sur. (2016.) potvrđuju superiornost sintetskog auksina NAA nad prirodnim IAA u poboljšanju fiziološke aktivnosti kulture kalusa ružmarina. Sakr i sur., (2018) iznose razlike u sadržaju esencijalnih ulja između tri sorte ružmarina *R. officinalis* (C1), *R. officinalis* Pyramidalis "Upright Rosemary" (C2) i *R. officinalis* Angustifolius "Pine scented" (C3). *R. officinalis* Angustifolius rezultirao je s najvišim postotkom esencijalnog ulja (0,95 %) što je četiri puta više od količine dobivene kod *R. officinalis* Pyramidalis, dok je ova sorta imala dvostruko više esencijalnog ulja od *R. officinalis* (C1 - 0,10 %), s verbenonom kao glavnim sastojkom u C1 i C3, dok je kamfor bio glavni sastojak u C2. U skladu s De-Mastro i sur., (2004.), količina i kvaliteta eteričnog ulja varira ovisno o vrsti i utjecaju okoliša, dok se komponente ne mijenjaju značajno. Yang i sur. (2009.) razvili su elitne klonske linije ružmarina *in vitro* kulturom biljnog tkiva za dobivanje prirodnih fenolnih antioksidansa. Inokulacijom klonskih linija ružmarina s *Pseudomonas sp.* povećao se udio ukupnih fenola

i ružmarinske kiseline te je na osnovu rezultata izneseno 5 klasa klonskih linija, što ukazuje na važnu ulogu mikrobnih elicitora u stimulaciji produkcije sekundarnih metabolita u biljkama.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija za kulturu tkiva

Cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na istraživanje mogućnosti mikropropagacije ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) putem kulture tkiva *in vitro*, koristeći hormone (BAP i IBA) na dva različita tipa eksplantata (bazalni dio - baza i pojedinačne izdanke).

Pokus je postavljen u laboratoriju za voćarstvo pri Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS).

U laboratoriju se provode *in vitro* istraživanja na različitim voćnim vrstama, uključujući lijesku, orah, borovnicu, višnju, malinu, trešnju, ružmarin, kupinu i mnoge druge. Znanstveno-nastavno osoblje voćarskog Odjela aktivno se angažira u nekoliko područja. Njihov fokus je prvenstveno na obrazovanju studenata, zatim pružanju savjeta proizvođačima voća te suradnji s gospodarstvom. Također, bave se proizvodnjom sadnog materijala te provode znanstveno-istraživački rad s ciljem unaprjeđenja selekcijskog i oplemenjivačkog rada razvijanjem i poboljšanjem protokola kulture biljnog tkiva.

Kako bi se istraživanja odvijala kvalitetno i uspješno, laboratorij je opremljen sa svom potrebnom opremom za *in vitro* uzgoj, kao što su autoklav, klima-komora, laminar, pH-metar, posude za rast, sterilizator, skalpeli, pincete, magnetna miješalica s grijalicom, bioreaktorske komore za rast (TIB/TIS imerznim sustav), itd.

#### 3.2. Biljni materijal, hranjiva podloga i tretmani u istraživanju

U istraživanju je korišten biljni materijal (Slika 3.) ružmarina uveden u kulturu tkiva prijašnjih godina, a isti se redovito održava te multiplicira u cilju prezervacije i obavljanja drugih istraživanja *in vitro*.



**Slika 3.** Biljni materijal

Korištena hranjiva podloga u istraživanju uključivala je mikro i makro elemente te vitamine MS (Murashige i Skoog, 1962.) formulacije. Svi tretmani sadržavali su istu koncentraciju hranjive podloge koju preporuča proizvođač (Duchefa Biochemie, Nizozemska), a sastav i koncentracije detaljno su opisane u tablici 2.

**Tablica 2.** Sastav MS hranjivog medija (Murashige i Skoog, 1962.)

| <i>Mikroelementi</i>                                   | <i>mg/l</i> | <i>Makroelementi</i>                | <i>mg/l</i> | <i>Vitamini</i>            | <i>mg/l</i> |
|--|-------------|-------------------------------------|-------------|----------------------------|-------------|
| <b>CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O</b>              | 0,025       | <b>CaCl<sub>2</sub></b>             | 332,02      | <b>Glicin</b>              | 2,00        |
| <b>CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O</b>              | 0,025       | <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | 170,00      | <b>Myo-inositol</b>        | 100,00      |
| <b>FeNaEDTA</b>  | 36,70       | <b>KNO<sub>3</sub></b>              | 1900,00     | <b>Nikotinska kiselina</b> | 0,50        |
| <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>                     | 6,20        | <b>MgSO<sub>4</sub></b>             | 180,54      | <b>Piridoksin HCl</b>      | 0,50        |
| <b>KI</b>  | 0,83        | <b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b> | 1650,00     | <b>Tiamin HCl</b>          | 0,10        |
| <b>MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</b>               | 16,90       |                                     |             |                            |             |
| <b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</b> | 0,25        |                                     |             |                            |             |
| <b>ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>              | 8,60        |                                     |             |                            |             |

Pripremljena hranjiva podloga je sterilizirana autoklaviranjem u režimu temperature od 121°C i tlaka od 1,2 bara, te vremenskim trajanjem od 20 minuta, a svaka teglica (tretmani) uključivala je po 100 ml sterilne hranjive podloge.

Tretmani u istraživanju (tablica 3.) uključivali su primjenu određene koncentracije biljnih hormona citokinina BAP (6-benzilaminopurin, 0,3 mg/l) i auksina IBA (Indol 3-maslačne kiseline, 0,01 mg/l). Kontrolni tretman, nazvan K (kontrola), nije sadržavao primjenu hormona (bez hormona).

**Tablica 3.** Prikaz tretmana i koncentracija u istraživanju

| Tretman                 | Hranjivi medij | Hormoni/ Koncentracija             | Kultivar                         |
|-------------------------|----------------|------------------------------------|----------------------------------|
| K – pojedinačni izdanci | MS             | 0                                  | <i>Rosmarinus officinalis L.</i> |
| K – baza                | MS             | 0                                  | <i>Rosmarinus officinalis L.</i> |
| T – pojedinačni izdanci | MS             | BAP 0,3 mg/l<br>+<br>IBA 0,01 mg/l | <i>Rosmarinus officinalis L.</i> |
| T - baza                | MS             | BAP 0,3 mg/l<br>+<br>IBA 0,01 mg/l | <i>Rosmarinus officinalis L.</i> |

Eksplantati su disecirani na nodijalne segmente veličine 4 do 5 cm, nakon čega su inicirani na hranjivi medij. Ovi segmenti predstavljali su tip eksplantata - pojedinačni izdanci. S druge strane, bazni dio eksplantata, bez kalusa i s uklonjenim izdancima, predstavljao je tip eksplantata – baza (slika 4.).



**Slika 4.** Disekcija *Rosmarinus officinalis L.* na a.) pojedinačne izdanke i b.) bazu

Pojedinačni izdanci i bazni dijelovi su inicirani na hranjivu podlogu pod sterilnim uvjetima laminarne komore (Slika 5.). Svaki tretman je sadržavao po 5 eksplantata u 2 repeticije, što ukupno čini 10 eksplantata po tretmanu.



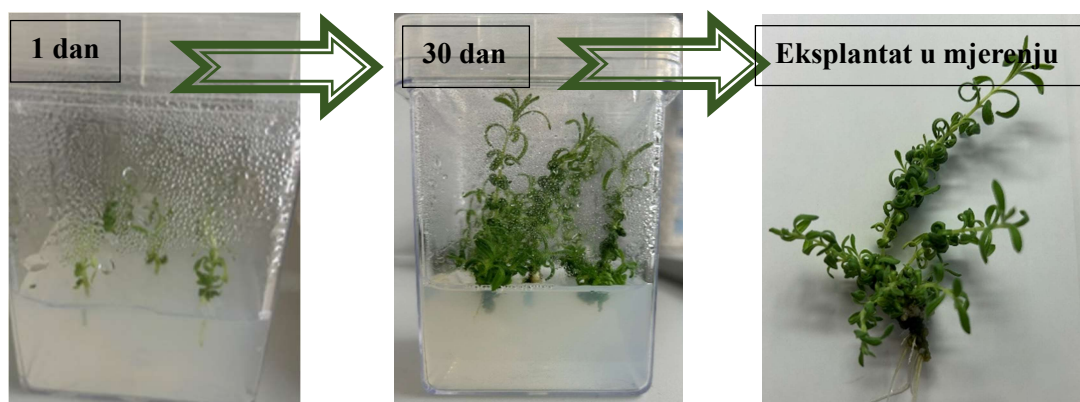
**Slika 5.** Pojedinačni izdanci i baze u hranjivom mediju

### 3.3. Mjerenja i obrada podataka u istraživanju

Nakon 30 dana kulture u klima komori pod režimom svjetlosti 16 sati svjetla i 8 sati tame, te temperaturom od oko 23 do 25 °C, svi tretmani su uspješno razvili povoljnu vegetativnu biomasu potrebnu za mjerenje morfoloških pokazatelja rasta.(Slika 6.).

Mjerenja su uključivala sljedeće morfološke i produktivne parametre:

- Broj izdanaka
- Broj lateralnih izdanaka
- Dužina izdanaka
- Broj listova
- Multiplikacija
- Vegetativna masa
- Masa kalusa



**Slika 6.** Dinamika rasta kroz 30 dana kulture i završni eksplantat u mjerenju



### **3.4. Obrada dobivenih podataka**

Obrada podataka obavljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2016. Također, korištena je i analiza varijance (ANOVA), te statistički testovi F-test i Fisher's LSD test (*engl.* Least Significant Difference).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati mjerenja promatranih morfoloških i produktivnih parametara ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) na kontrolnom tretmanu (K)

Iz navedenih rezultata u Tablici 4., za kontrolni tretman koji uključuje eksplantate bazalnog dijela (tretman K-baza), broj izdanaka se kretao od 5 do 10, odnosno prosječno 6 izdanaka. Broj lateralnih izdanaka kretao se od 0 pa sve do 8, tj. prosječno 2 bočna izdanka. Dužina izdanaka (cm) kretala se u rasponu od 2,01 cm do 3,60 cm, odnosno prosječno 2,67 cm. Broj listova na eksplantatima kretao se u rasponu od 12 do 18 listova po izdanku, odnosno prosječno 16 listova. Multiplikacija (produktivnost) kretala u rasponu od 5 do najviše 12, tj. prosječno 8. Masa kalusa (g) se kretala od 0,10 g do 0,73 g, s prosječnom gramažom kalusa od 0,22 g., a vegetativna masa (g) od 0,27 g do 0,78 g, prosječno 0,56 g.

U kontrolnom tretmanu s pojedinačnim izdancima (Tablica 4.), primijetili smo da je broj izdanaka bio znatno manji u usporedbi s tretmanom K - baza, kretao se u rasponu od 1 do najviše 8 izdanaka, s prosječno 3 izdanka. Također, broj lateralnih izdanaka varirao je od 0 do 10, prosječno 3 bočna izdanka. Dužina izdanaka (cm) bila je između 1,75 cm i 5,70 cm, s prosječnom dužinom od 3,28 cm. Broj listova kretao se u rasponu od 13 do 39 listova, s prosječno 19 listova. Multiplikacija je varirala od 2 do 9, s prosječnom vrijednošću od 5. Najmanja masa kalusa (g) iznosila je 0,05 g, dok je najveća masa kalusa bila 0,71 g, s prosječnom masom od 0,25 g. Najveća težina vegetativne mase (g) bila je 0,96 g, dok je najmanja bila 0,14 g, s prosječnom vrijednošću od 0,41 g.

**Tablica 4.** Rezultati mjerenja morfoloških i produktivnih parametara ružmarina na kontrolnom tretmanu (K)

| <i>Tretman</i>                 | <i>Broj izdanaka</i> | <i>Broj lateralnih izdanaka</i> | <i>Dužina izdanaka (cm)</i> | <i>Broj listova</i> | <i>Multiplikacija</i> | <i>Masa kalusa (g)</i> | <i>Vegetativna masa (g)</i> |
|--------------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|
| <i>K - baza</i>                | 5                    | 8                               | 3,58                        | 18                  | 8                     | 0,21                   | 0,55                        |
| <i>K - baza</i>                | 10                   | 1                               | 2,08                        | 13                  | 12                    | 0,12                   | 0,57                        |
| <i>K - baza</i>                | 4                    | 3                               | 2,13                        | 17                  | 5                     | 0,16                   | 0,56                        |
| <i>K - baza</i>                | 6                    | 2                               | 2,57                        | 15                  | 8                     | 0,21                   | 0,38                        |
| <i>K - baza</i>                | 5                    | 0                               | 2,56                        | 17                  | 8                     | 0,10                   | 0,27                        |
| <i>K - baza</i>                | 5                    | 2                               | 3,60                        | 21                  | 8                     | 0,21                   | 0,73                        |
| <i>K - baza</i>                | 7                    | 2                               | 2,01                        | 12                  | 9                     | 0,16                   | 0,42                        |
| <i>K - baza</i>                | 6                    | 2                               | 2,38                        | 17                  | 7                     | 0,15                   | 0,53                        |
| <i>K - baza</i>                | 6                    | 1                               | 2,83                        | 17                  | 8                     | 0,11                   | 0,81                        |
| <i>K - baza</i>                | 9                    | 1                               | 2,76                        | 15                  | 11                    | 0,73                   | 0,78                        |
| <b><i>Prosjek</i></b>          | <b>6</b>             | <b>2</b>                        | <b>2,67</b>                 | <b>16</b>           | <b>8</b>              | <b>0,22</b>            | <b>0,56</b>                 |
| <i>K - pojedinačni izdanci</i> | 1                    | 3                               | 4,70                        | 25                  | 2                     | 0,25                   | 0,14                        |
| <i>K - pojedinačni izdanci</i> | 5                    | 2                               | 1,90                        | 21                  | 5                     | 0,16                   | 0,39                        |
| <i>K - pojedinačni izdanci</i> | 3                    | 0                               | 3,43                        | 16                  | 4                     | 0,14                   | 0,83                        |
| <i>K - pojedinačni izdanci</i> | 8                    | 3                               | 2,24                        | 15                  | 9                     | 0,06                   | 0,63                        |
| <i>K - pojedinačni izdanci</i> | 1                    | 6                               | 4                           | 39                  | 2                     | 0,12                   | 0,24                        |
| <i>K - pojedinačni izdanci</i> | 4                    | 2                               | 2,2                         | 15                  | 6                     | 0,67                   | 0,21                        |
| <i>K - pojedinačni izdanci</i> | 3                    | 5                               | 3,33                        | 23                  | 4                     | 0,18                   | 0,34                        |
| <i>K - pojedinačni izdanci</i> | 1                    | 10                              | 3,50                        | 23                  | 2                     | 0,71                   | 0,18                        |
| <i>K - pojedinačni izdanci</i> | 6                    | 0                               | 1,75                        | 13                  | 7                     | 0,14                   | 0,15                        |
| <i>K - pojedinačni izdanci</i> | 2                    | 1                               | 5,70                        | 25                  | 8                     | 0,05                   | 0,96                        |
| <b><i>Prosjek</i></b>          | <b>3</b>             | <b>3</b>                        | <b>3,28</b>                 | <b>22</b>           | <b>5</b>              | <b>0,25</b>            | <b>0,41</b>                 |

#### **4.2. Rezultati mjerenja promatranih morfoloških i produktivnih parametara ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) na tretmanu s hormonima (T)**

Tretman koji je uključivao primjenu hormona citokinina i auksina (BAP i IBA) na baznom tipu eksplantata (T - baza) rezultirao je sljedećim vrijednostima morfoloških i produktivnih parametara (Tablica 5.). Broj izdanaka kretao se od najmanjeg 1 do najviše 10 izdanaka, odnosno prosječno 5 izdanaka. Broj lateralni izdanaka varirao je od 0 do 12, tj. prosječno 4 lateralna izdanaka. Dužina izdanaka kretala se od 2 cm do 3,83 cm, prosječno 2,78 cm. Broj listova kretao se u rasponu od 12 do 29, tj. prosječno 17 listova. Multiplikacija se kretala od 1 do 12, prosječno 6, a masa kalusa od 0,14 do 0,27g, tj. prosječno 0,19 grama. Vegetativna masa kretala se u rasponu od 0,24 g do 0,61 g, ili prosječno 0,39 grama.

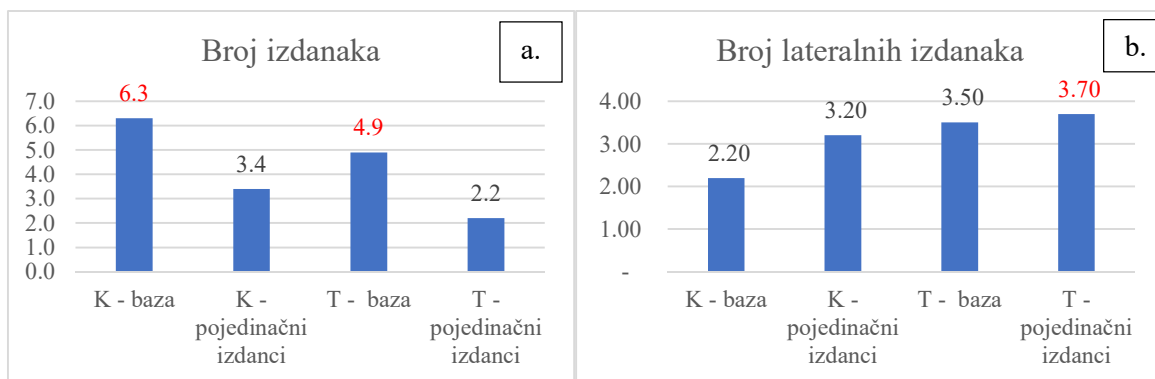
Prema tablici 5., tretman koji je uključivao eksplantate tipa pojedinačnih izdanaka (T – pojedinačni izdanci) rezultirao je brojem izdanaka u rasponu od 1 do 5, tj. prosječno 2 izdanaka. Broj lateralnih izdanaka kretala se od 0 do 10 (prosječno 4). Dužina izdanaka kretala se od najmanje vrijednosti 2,06 cm do najveće vrijednosti 7,30 cm i prosjekom 4,22 cm. Najveći broj listova iznosio je 45, a najmanji 14, odnosno prosječno 29 listova po izdanku. Multiplikacija se kretala u rasponu od najmanje 2 do najviše 6 (prosječno 3). Najveća masa kalusa (g) iznosila je 0,28 g, dok je najmanja iznosila 0,14 g, (prosječno 0,21 g). Vegetativna masa (g) kretala se u rasponu od 0,15 g do 0,43 g, s prosjekom od 0,30 g.

**Tablica 5.** Rezultati mjerenja morfoloških i produktivnih parametara ružmarina na tretmanu s hormonima (T)

| <i>Tretman</i>                 | <i>Broj izdanaka</i> | <i>Broj lateralnih izdanaka</i> | <i>Dužina izdanaka (cm)</i> | <i>Broj listova</i> | <i>Multiplikacija</i> | <i>Masa kalusa (g)</i> | <i>Vegetativna masa (g)</i> |
|--------------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|
| <i>T - baza</i>                | 10                   | 0                               | 3                           | 15                  | 12                    | 0,20                   | 0,51                        |
| <i>T - baza</i>                | 8                    | 0                               | 2,24                        | 13                  | 8                     | 0,19                   | 0,28                        |
| <i>T - baza</i>                | 4                    | 3                               | 3,45                        | 20                  | 5                     | 0,21                   | 0,39                        |
| <i>T - baza</i>                | 5                    | 3                               | 2,25                        | 12                  | 6                     | 0,27                   | 0,24                        |
| <i>T - baza</i>                | 7                    | 0                               | 2,47                        | 14                  | 9                     | 0,12                   | 0,31                        |
| <i>T - baza</i>                | 5                    | 5                               | 3                           | 18                  | 6                     | 0,21                   | 0,37                        |
| <i>T - baza</i>                | 1                    | 7                               | 2                           | 15                  | 1                     | 0,14                   | 0,42                        |
| <i>T - baza</i>                | 5                    | 2                               | 3,24                        | 16                  | 8                     | 0,26                   | 0,31                        |
| <i>T - baza</i>                | 1                    | 12                              | 2                           | 18                  | 1                     | 0,15                   | 0,61                        |
| <i>T - baza</i>                | 3                    | 3                               | 3,83                        | 29                  | 4                     | 0,14                   | 0,43                        |
| <i>Prosjek</i>                 | <b>5</b>             | <b>4</b>                        | <b>2,78</b>                 | <b>17</b>           | <b>6</b>              | <b>0,19</b>            | <b>0,39</b>                 |
| <i>T - pojedinačni izdanci</i> | 4                    | 4                               | 2,25                        | 18                  | 5                     | 0,19                   | 0,33                        |
| <i>T - pojedinačni izdanci</i> | 2                    | 1                               | 3,65                        | 24                  | 4                     | 0,16                   | 0,29                        |
| <i>T - pojedinačni izdanci</i> | 1                    | 4                               | 7,10                        | 45                  | 3                     | 0,14                   | 0,27                        |
| <i>T - pojedinačni izdanci</i> | 1                    | 2                               | 5                           | 35                  | 2                     | 0,26                   | 0,27                        |
| <i>T - pojedinačni izdanci</i> | 2                    | 10                              | 2,80                        | 30                  | 2                     | 0,17                   | 0,43                        |
| <i>T - pojedinačni izdanci</i> | 1                    | 5                               | 7,30                        | 45                  | 2                     | 0,24                   | 0,35                        |
| <i>T - pojedinačni izdanci</i> | 3                    | 0                               | 2,50                        | 16                  | 3                     | 0,26                   | 0,15                        |
| <i>T - pojedinačni izdanci</i> | 5                    | 1                               | 2,06                        | 14                  | 6                     | 0,25                   | 0,20                        |
| <i>T - pojedinačni izdanci</i> | 2                    | 4                               | 3,45                        | 35                  | 4                     | 0,28                   | 0,37                        |
| <i>T - pojedinačni izdanci</i> | 1                    | 6                               | 6,10                        | 33                  | 2                     | 0,17                   | 0,34                        |
| <i>Prosjek</i>                 | <b>2</b>             | <b>4</b>                        | <b>4,22</b>                 | <b>29</b>           | <b>3</b>              | <b>0,21</b>            | <b>0,30</b>                 |

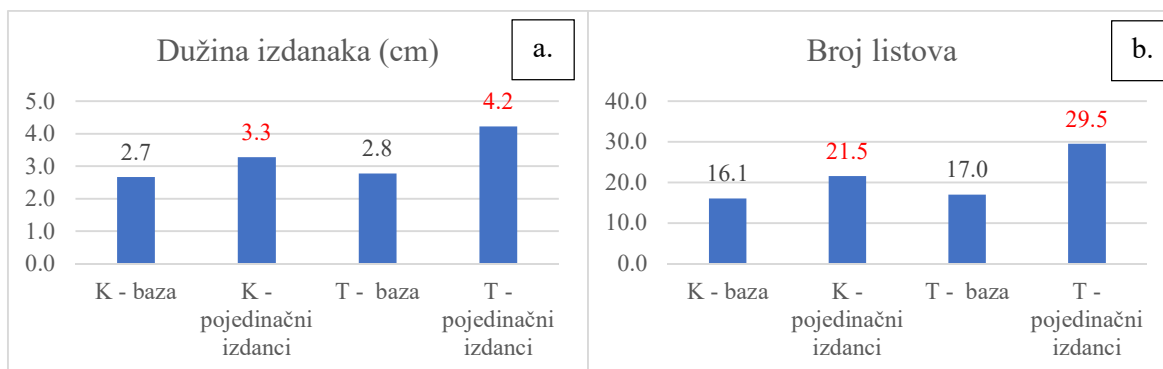
## 5. RASPRAVA

Nakon 30 dana kulture nije utvrđena kontaminacija niti na jednom od ispitivanih tretmana. Također, u istraživanju nisu utvrđeni znakovi stresnog stanja uzgojnih uvjeta (žućenje, otpuštanje fenola u hranjivi medij, odumiranje ili slično) te su svi tretmani i eksplantati nakon 30 dana razvili idealne attribute (biomasu) potrebne za pravilno mjerenje i provođenje evaluacije ovog istraživanja.



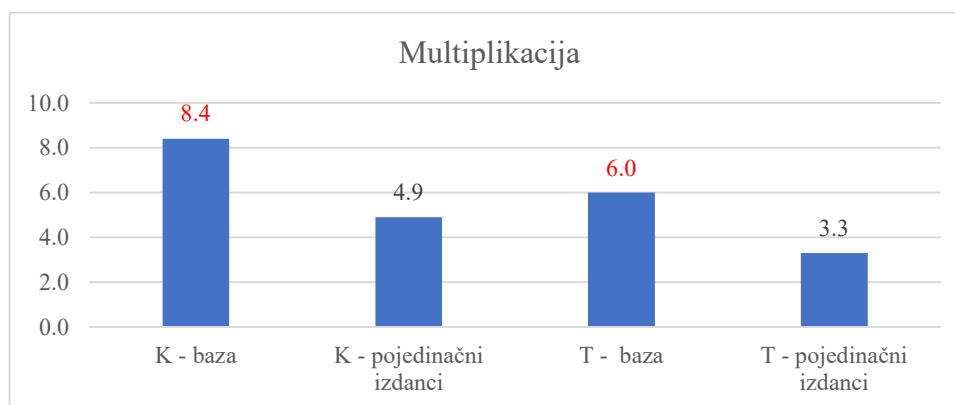
**Grafikon 1.** Razlike između tretmana (K i T) i tipova eksplantata (baza i pojedinačni izdanci) u broju izdanaka (a) i broju lateralnih izdanaka (b).

Prema grafikonu 1a., kontrolni tretman K ali i tretman s hormonima T koji su uključivali bazni tip eksplantata (K - 6,3 i T - 4,9) rezultirali su s najvećim brojem izdanaka. Broj lateralnih izdanaka (Grafikon 1b.) bio je najveći na tretmanu s hormonima (T) koji je uključivao eksplantate pojedinačnog tipa (T - pojedinačni izdanci), a razvio je prosječno 3,7 nova lateralna izdanaka. Također i tretman T - baza rezultirao je većim brojem lateralnih izdanaka (3,5) u odnosu na oba kontrolna tretmana (K - baza 2,2 i K - pojedinačni izdanci 3,2).



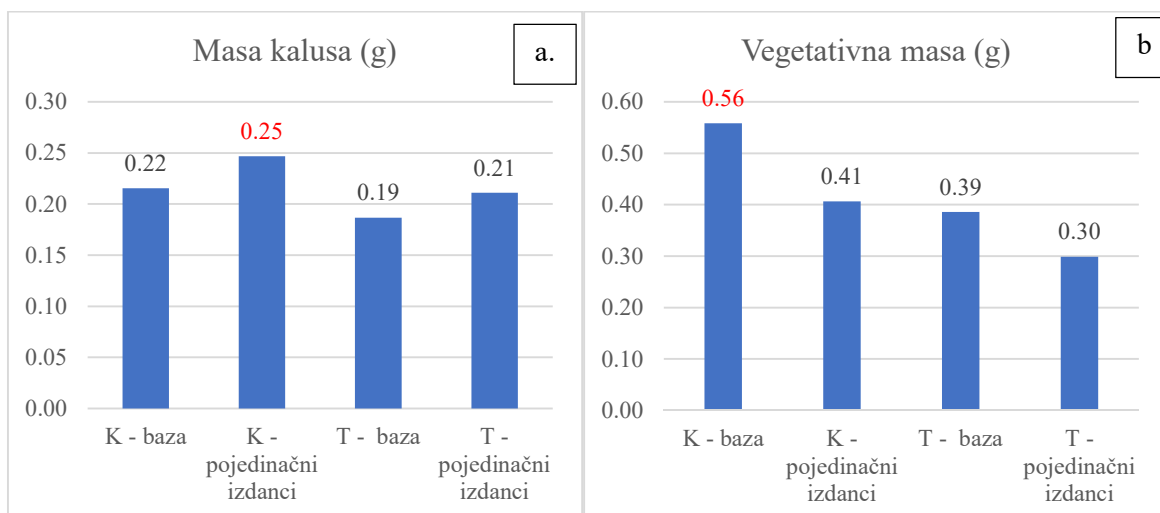
**Grafikon 2.** Razlike između tretmana (K i T) i tipova eksplantata (baza i pojedinačni izdanci) u dužini izdanaka (a) i broju listova (b).

Dužina izdanaka (Grafikon 2a.), na oba tretmana (K – 3,3 i T – 4,2) s pojedinačnim izdancima bila je veća u odnosu na izdanke nastale iz baznog tipa eksplantata (baza K – 2,7 i baza T – 2,8). Sukladno prethodno iznesenom i broj listova (Grafikon 2b.) pratio je dinamiku rasta izdanaka, odnosno na eksplantatima koji su razvili duže izdanke (pojedinačni izdanci na oba tretmana – K i T) razvio se i veći broj listova (K – 21,5 i T – 29,5) u odnosu na bazni tip eksplantata (K – 16,1 i T – 17).



**Grafikon 3.** Razlike između tretmana (K i T) i tipova eksplantata (baza i pojedinačni izdanci) u multiplikaciji (produktivnosti).

Najveća produktivnost ružmarina (Grafikon 3.), odnosno multiplikacija dobivena je na kontrolnom tretmanu s baznim tipom eksplantata (K – baza, 8,4), zatim tretmanu s hormonima T – baza (6,0), K – pojedinačni izdanci (4,9) i najmanja na tretmanu T – pojedinačni izdanci (3,3).



**Grafikon 4.** Razlike između tretmana (K i T) i tipova eksplantata (baza i pojedinačni izdanci) u masi kalusa (a) i vegetativnoj masi (b).

Masa kalusa (g) kretala se od 0,19 do 0,25 grama (Grafikon 4a.), pri čemu je najveća bila kod kontrolnog tretmana (K) s pojedinačnim tipom eksplantata, a najmanja kod tretmana s hormonima (T – 0,19) koji je uključivao eksplantate baznog tipa. Najveća biomasa (vegetativna masa) dobivena je na kontrolnom tretmanu (Grafikon 4b.) s baznim tipom eksplantata (K – baza 0,56 g), zatim kontrolnom tretmanu s pojedinačnim izdancima (K – pojedinačni izdanci 0,41 g), dok su tretmani s hormonima rezultirali i s manjom vegetativnom masom od 0,39 (T – baza) i 0,30 (T – pojedinačni izdanci) grama.

Prema tablici 6. te slikama 7. i 8. na razini cijelog pokusa bazni tip eksplantata razvio je značajno veći broj izdanaka (baza – 5,6), a sukladno tome i multiplikaciju (baza – 7,2) u odnosu na pojedinačni tip eksplantata kod oba primijenjena tretmana (K – 6,3 / 6,0 i T – 4,9 / 8,4). Također i na slikama 7. i 8. gdje je prikazana dinamika rasta eksplantata po tretmanima, vidljiva je značajno veća produkcija vegetativne mase (izdanci) nakon 30 dana kulture kod oba tretmana (K i T) s baznim tipom eksplantata. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana i tipova eksplantata u broju lateralnih izdanaka ( $p = 0,53$ ), masi kalusa ( $p = 0,56$ ) i vegetativnoj masi ( $p = 0,06$ ). Dužina izdanaka (3,75) i broj listova (25,52) na razini cijelog pokusa bila je značajno veća kod pojedinačnog tipa eksplantata. Tretman s hormonima (T – BAP + IBA) rezultirao je jedino značajno dužim izdancima kod pojedinačnog tipa eksplantata (T – 4,2).

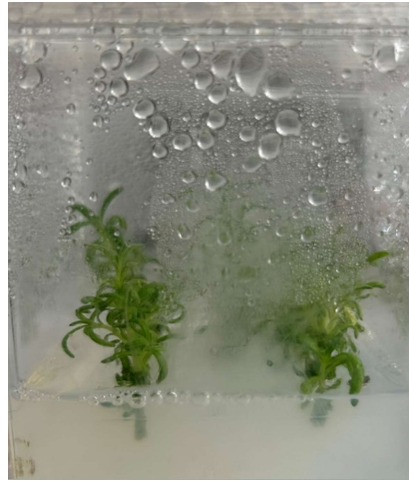
**Tablica 6.** Statističke razlike između tipova eksplantata u promatranim parametrima na razini cijelog pokusa, tretmanu s BAP + IBA (T) i kontrolnog tretmana (K- bez hormona).

|                                   |                            | <i>Broj izdanaka</i> | <i>Broj lateralnih izdanaka</i> | <i>Dužina izdanaka</i> | <i>Broj listova</i> | <i>Multiplikacija</i> | <i>Masa kalusa</i> | <i>Vegetativna masa</i> |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|
| <i>Na razini cijelog pokusa</i>   | <b>Baza</b>                | 5,6 A                | 2,85                            | 2,72 B                 | 16,55 B             | 7,2 A                 | 0,20               | 0,47                    |
|                                   | <b>Pojedinačni izdanci</b> | 2,8 B                | 3,45                            | 3,75 A                 | 25,52 A             | 4,1 B                 | 0,23               | 0,35                    |
|                                   | <b>F – test</b>            | 15,52                | 0,40                            | 6,41                   | 13,69               | 13,99                 | 0,34               | 3,74                    |
|                                   | <b>p</b>                   | 0,0004               | 0,5318                          | 0,0185                 | 0,0011              | 0,0007                | 0,5662             | 0,0611                  |
| <i>T – BAP + IBA</i>              | <b>Baza</b>                | 4,9 A                | 3,5                             | 2,8 B                  | 17,01 B             | 6,0 A                 | 0,19               | 0,39                    |
|                                   | <b>Pojedinačni izdanci</b> | 2,2 B                | 3,7                             | 4,2 A                  | 29,50 A             | 3,3 B                 | 0,21               | 0,30                    |
|                                   | <b>F – test</b>            | 7,09                 | 0,02                            | 4,71                   | 10,54               | 5,20                  | 1,16               | 3,89                    |
|                                   | <b>p</b>                   | 0,0195               | 0,8960                          | 0,0532                 | 0,0066              | 0,0417                | 0,2950             | 0,0657                  |
| <i>K – kontrola (bez hormona)</i> | <b>Baza</b>                | 6,3 A                | 2,2                             | 2,67                   | 16,09 B             | 8,4 A                 | 0,22               | 0,56                    |
|                                   | <b>Pojedinačni izdanci</b> | 3,4 B                | 3,2                             | 3,28                   | 21,54 A             | 4,9 B                 | 0,25               | 0,41                    |
|                                   | <b>F – test</b>            | 9,17                 | 0,70                            | 1,84                   | 4,61                | 11,82                 | 0,11               | 1,94                    |
|                                   | <b>p</b>                   | 0,0075               | 0,4160                          | 0,1989                 | 0,0547              | 0,0032                | 0,7466             | 0,1849                  |





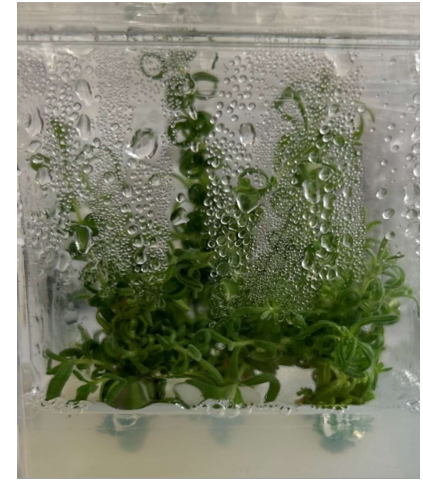
0 dan



7 dan



15 dan



30 dan

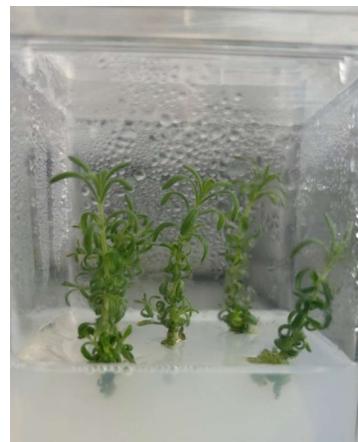
*K (kontrola) – a. bazni tip eksplantata*



0 dan



7 dan



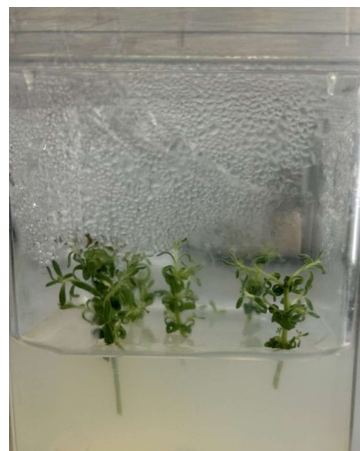
15 dan



30 dan

*K (kontrola) – b. pojedinačni izdanci*

**Slika 7.** Dinamika rasta (30 dana) eksplantata (a. bazni i b. pojedinačni izdanci) na kontrolnom tretmanu (K), (Foto: Laura Lovrić, 2023.)



0 dan



7 dan



15 dan



30 dan

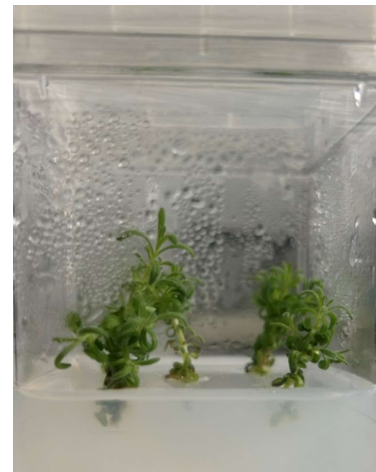
*T (hormoni) – a. bazni tip eksplantata*



0 dan



7 dan



15 dan



30 dan

*T (hormoni) – b. pojedinačni izdanci*

**Slika 8.** Dinamika rasta (30 dana) eksplantata (a. bazni i b. pojedinačni izdanci) na tretmanu s hormonima (T), (Foto: Laura Lovrić, 2023.)

Pojedini autori (Misra i Chaturvedi, 1983.; Mascarello i sur., 2017.) u svojim istraživanjima iznose rezultate boljeg porasta izdanaka nastalih iz nodijalnog tipa eksplantata u odnosu na vršni tip eksplantata što u našem slučaju nije potvrđeno. Misra i Chaturvedi (1983.) iznose da je citokinin 6-benzilaminopurin (BAP) u koncentraciji od 0,2 mg/l u usporedbi s kinetinom (KN) pokazao veću učinkovitost u indukciji novih izdanaka. Također i Vasile i sur., (2015.) iznose pozitivne učinke BAP-a (0,2 mg/l) i IAA na multiplikaciju. Ovi navodi nisu potvrđeni u našem istraživanju, odnosno tretman s BAP u koncentraciji od 0,3 mg/l u našem istraživanju nije inicirao razvoj većeg broja izdanaka, a time i multiplikaciju u odnosu na kontrolni tretman (bez hormona). Masoody i Florin (2015.) iznose pozitivni utjecaj BAP-a na rast kalusa u koncentraciji od 2 mg/l što u našem slučaju nije utvrđeno iako je koncentracija iznosila svega 0,3 mg/l (nema značajne razlike u masi kasula između tretmana i eksplantata). Iako pojedini istraživači (El-Zefzafy i sur., 2016.; Mascarello i sur., 2017.) iznose pozitivne rezultate u produkciji i proizvodnim parametrima kalusa (veličina, svježina i suha tvar) upotrebom hormona (BAP, TDZ, NAA, IAA) u našem istraživanju nije utvrđen značajan utjecaj primijenjenih hormona (BAP i IBA) na produkciju i masu kalusa ružmarina.

Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti na ispitivanje utjecaja većih koncentracija primijenjenih hormona te primjene mnogih drugih vrsta citokinina i auksina koji se koriste u kulturi biljnog tkiva, a posebice trenutno vrlo aktualnog citokinina meta-Topolina (mT). Također, u cilju dobivanja boljih rezultata napraviti pojedine analize sadržaja eteričnih ulja u biomasi, a posebice u kalusu na primijenjenim tretmanima. MS hranjivi medij bez dodataka biljnih hormona te bazni tip eksplantata prema dobivenim rezultatima u našem istraživanju predstavljaju najidealnije komponente protokola ukoliko nam cilj produkcija biomase ružmarina, odnosno proizvodnja sadnog materijala ili multiplikacija *in vitro*.

## 6. ZAKLJUČAK

Kultura biljnog tkiva ili mikropropagacija kao grana biotehnologije u biljnoj proizvodnji ima izrazitu ulogu u razvoju moderne poljoprivrede i hortikulture. Uporabom ove tehnike unaprijeđen je oplemenjivački rad, a istom se omogućuje znatno povećanje učinkovitosti razmnožavanja biljnih vrsta, mogućnost eliminacije biljnih patogena i očuvanje biološke raznolikosti.

Razvoj učinkovitih protokola za mikro - razmnožavanje biljnih vrsta, posebice biljnih vrsta koje je teško razmnožavati klasičnim načinima, može pomoći razvoju hrvatskog rasadničkog sektora u proizvodnji sadnog materijala prema europskim standardima.

Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnosti mikropropagacije ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) u kulturi tkiva *in vitro*.

Na osnovu dobivenih rezultata u ovom završnom radu zaključujemo sljedeće:

- Nakon 30 dana kulture nije utvrđena kontaminacija niti na jednom od ispitivanih tretmana, te su svi tretmani i eksplantati razvili idealne atribute (biomasu) potrebne za pravilno mjerenje i provođenje evaluacije ovog istraživanja.
- Statistička analiza pokazuje značajne razlike između tipova eksplantata u broju izdanaka i multiplikaciji, dok u broju lateralnih izdanaka, masi kalusa i vegetativnoj masi nije bilo značajnih razlika.
- Kontrolni tretman (K) ali i tretman s hormonima (T) koji su uključivali bazni tip eksplantata rezultirali su s najvećim brojem izdanaka.
- Broj lateralnih izdanaka bio je najveći na tretmanu s hormonima (T) koji je uključivao eksplantate pojedinačnog tipa.
- Dužina izdanaka i broj listova na oba tretmana (K i T) s pojedinačnim izdancima bio je veći u odnosu na izdanke nastale iz baznog tipa eksplantata.
- Produktivnost (multiplikacija) je bila najviša kod kontrolnog tretmana s baznim tipom eksplantata.
- Naši rezultati sugeriraju da MS hranjivi medij bez dodataka biljnih hormona te bazni tip eksplantata predstavljaju vrijedne smjernice za daljnja istraživanja u razvoju protokola za produkciju biomase ružmarina, proizvodnju sadnog materijala ili *in vitro* multiplikaciju.

- Daljnja istraživanja usmjeriti na ispitivanje učinaka većih koncentracija primijenjenih hormona i primjenu drugih citokinina i auksina, uključujući meta-Topolin (mT), koji je trenutno vrlo aktualan u istraživačkoj praksi.

## 7. LITERATURA

1. Al Masoody i sur. (2015): Effect of growth regulators on in vitro callus formation of rosemary plant (*Rosmarinus officinalis* L.). Bulletin UASVM Horticulture, 72(1), 131-137.
2. Al Masoody i sur. (2015): The effect of growth regulators on callus colors and production of somatic embryos in vitro of rosemary plant (*Rosmarinus officinalis* L.). IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, 8(9):96-100.
3. Al Masoody i sur. (2015): Effect of growth regulators for the induction of callus from the apical bud on in vitro of rosemary plant (*Rosmarinus officinalis* L.). International Research Journal of Engineering and Technology, 2(3):811-814.
4. Begum, A., Sandhya, S., Vinod, K. R., Reddy, S. i Banji, D. (2013): An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria, 12(1), 61-74.
5. Bel-Rhliid, R., Crespy, V., Page-Zoerkler, N., Nagy, K., Raab, T. i Hansen, C. E. (2009): Hydrolysis of rosmarinic acid from rosemary extract with esterases and *Lactobacillus johnsonii* in vitro and in a gastrointestinal model. Journal of agricultural and food chemistry, 57(17), 7700-7705.
6. Cachiță-Cosma, D. (1987): Metode in vitro la plantele de cultură. Editura Ceres, București.
7. Caruso, J. L., Callahan, J., DeChant, C., Jayasimhulu, K. i Winget, G. D. (2000): Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. Plant Cell Reports, 19, 500-503.
8. Cristea, V. (2010): Culturi in vitro fotoautotrofe la specii de *Dianthus* endemice și periclitare din România. Todesco. Editura Todesco, Cluj-Napoca.
9. Darwesh, H. Y. i Alayafi, A. A. (2018): In vitro propagation response of *Rosmarinus officinalis* L. to biotic and abiotic elicitors on phenolic content and photosynthetic pigments. J. Agric. Sci, 10, 301-307.
10. Darwesh, H.Y. i Aisha, A.A. (2018). In vitro propagation response of *Rosmarinus officinalis* L. to biotic and abiotic elicitors on phenolic content and photosynthetic pigments. Journal of Agricultural Science, 10(2):301-307.
11. De Mastro, G., Ruta, C. i Marzi, V. (2004): Agronomic and technological assessment of oregano (*Origanum vulgare* ssp.) biotypes. Acta Horticulturae, 629, 355-363.

12. Debergh, P. i Maene, L. (1977): Rapid clonal propagation of pathogen-free *Pelargonium* plants starting from shoot tips and apical meristems. In Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes 78 (pp. 449-454).
13. El-Zefzafy, M.M., Dawoud, M.G.T., i Shahhat, A.M.I.M. (2016). Physiological and phytochemical responses of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) plant on in vitro callus formation. *European Journal of Medicinal Plants*, 17(3):1-16.
14. Fira, A. (2013): The optimization of micropropagation techniques for some fruit and ornamental shrub cultivars (Doctoral dissertation, PhD thesis/A. Fira).
15. George, E. F., Hall, M. A. i De Klerk, G. J. (2008): *Plant propagation by tissue culture* 3rd Edition. The Netherland, The Back Ground Springer.
16. González-Minero, F. J., Bravo-Díaz, L. i Ayala-Gómez, A. (2020): *Rosmarinus officinalis* L.(Rosemary): An ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics. *Cosmetics*, 7(4), 77.
17. Grigoriadou, K., Krigas, N., Sarropoulou, V., Papanastasi, K., Tsoktouridis, G. i Maloupa, E. (2019): In vitro propagation of medicinal and aromatic plants: The case of selected Greek species with conservation priority. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(6), 635-646.
18. Husain, Z. M. A. i Jawad, L. K. (2019): Effect of some growth regulators on the multiplication and stimulating the production of the volatile oil of *Rosemary officinalis* in vitro. *Plant Arch*, 19, 1773-1782.
19. Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., i Sotomayor, J. A. (2012): Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(38), 9603-9608.
20. Leelavathi, D. i Kuppan, N. (2013): In vitro regeneration from apical bud explant of *Rosmarinus officinalis* L.: An important medicinal plant. *Banat's Journal of Biotechnology*, 6(8):14-19.
21. Leelavathi, D., Kuppan, Y. i Kuppan, N. (2013): An efficient protocol for in vitro aseptic shoot multiplication and plant regeneration of *Rosmarinus officinalis*-an important medicinal plant using axillary bud. *Int J Pure App Biosci*, 1(6), 51-55.
22. Leelavathi, D., Yashoda. i Narendra, K. (2013). An efficient protocol for in vitro aseptic shoot multiplication and plant regeneration of *Rosmarinus officinalis*: An important medicinal plant using axillary bud. *Indian Journal of Pure and Applied Biosciences*, 1(6):51-55.

23. Manoharachary, C. i Nagaraju, D. (2016): Medicinal plants for human health and welfare. *Ann. Phytomed*, 5(1), 24-34.
24. Marin, J. i Gella, R. (1987): Factors affecting acclimatisation of micropropagated *Prunus cerasus* L.
25. Mascarello, C., Sacco, E., Pamato, M., Silvestro, D., Bassolino, L., Cervelli, C. i Ruffoni, B. (2017): *Rosmarinus officinalis* L.: Micropropagation and callus induction for cell biomass development. *Acta Horticulturae*, 1155:631-636.
26. Misra, P. i Chaturvedi, H.C. (1983): Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3:163-168.
27. Murashige, T. (1974): Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.
28. Murashige, T. i Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3).
29. Pérez-Mendoza, M. B., Llorens-Escobar, L., Vanegas-Espinoza, P. E., Cifuentes, A., Ibáñez, E. i Villar-Martínez, A. A. D. (2020): Chemical characterization of leaves and calli extracts of *Rosmarinus officinalis* by UHPLC-MS. *Electrophoresis*, 41(20), 1776-1783.
30. Sakr, S.S., Ayman, Y.A., EL-Mewafy, A., EL-Mewafy, i Nevien, M.E. (2018): Effect of medium type, cytokinin kind and sodium chloride stress on in vitro callus, shoot formation and composition of volatile oil of three cultivars of rosemary plant. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 8(3):856-864.
31. Sakr, S.S., Ayman,, Y.A., EL-Mewafy, A., EL-Mewafy. i Nevien, M.E. (2018): In vitro comparative study on *Rosmarinus officinalis* L. cultivars. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 7(3):703-715.
32. Skalicky, M., Kubes, J., Hejnak, V., Tumova, L., Martinkova, J., Martin, J. i Hnilickova, H. (2018): The Production of Isoflavones by *Genista tinctoria* L. In Vitro Culture after Two Vanadium Compounds Application. Possible Transport Mechanism of Secondary Metabolites through Plasma Membrane.
33. Stănică, F., Dumitrașcu, M., Davidescu, V., Madjar, R. i Peticila, A. G. (2002): Inmultirea plantelor horticole lemnoase. Editura Ceres, Bucuresti. Romania, 216-317.
34. Sutter, E. i Langhans, R. W. (1978): Tissue culture propa-gation of *Anemone coronaria*. *HortScience*, 13, 348.



35. Tawfik, A. A., Read, P. E. i Cuppett, S. L. (1998): *Rosmarinus officinalis* L.(Rosemary): In vitro culture, regeneration of plants, and the level of essential oil and monoterpenoid constituents. *Medicinal and Aromatic Plants X*, 349-365.
36. Vasile, L., Agud, E.M. i Zăpârban, M. (2015): The regenerative and in vitro multiplication capacity of apical tissue of *Rosmarinus officinalis* L, on mediums with low hormones content. *Analele Universității din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului*, 24:171-180.
37. Vijai Selvaraj, K.S., Sivakumar, P., Varshini Shalom, S., Bharathi, A., Velayutham, A., Prabha, T. (2022): A review on the in vitro regeneration of the timeless panacean medicinal and aromatic herb: *Rosmarinus officinalis* (L.). *Ann. Phytomed.*, 11(1):247-252.

**Internetski izvori:**

<https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0221>

<https://www.spiceography.com/rosemary/>

<https://hr.wikipedia.org/wiki/Ru%C5%BEmarin>

<https://www.plantea.com.hr/ruzmarin/>

<https://www.enciklopedija.hr/clanak/ruzmarin>

## 8. SAŽETAK

Istraživanje s ciljem ispitivanja mogućnosti mikropropagacije ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) u kulturi biljnog tkiva *in vitro* uvjetima provedeno je na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek tijekom 2023. godine. U istraživanju je korištena MS hranjiva podloga s i bez dodataka hormona BAP i IBA. Ispitivana je razlika u produktivnosti i morfološkim pokazateljima na dva tipa eksplantata (pojedinačni i bazni tip). Nakon 30 dana kulture svi tretmani razvili su idealnu biomasu potrebnu za evaluaciju istraživanja. Statistička analiza pokazala je značajne razlike između tipova eksplantata u broju izdanaka i multiplikaciji, dok u broju lateralnih izdanaka, masi kalusa i vegetativnoj masi nije bilo značajnih razlika. Kontrolni tretman i tretman s hormonima na baznom tipu eksplantata rezultirali su najvećim brojem izdanaka. Najveći broj lateralnih izdanaka zabilježen je kod tretmana s hormonima koji je uključivao eksplantate pojedinačnog tipa. Dužina izdanaka i broj listova bili su veći kod tretmana s pojedinačnim izdancima u odnosu na bazne eksplantate. Najveća produktivnost (multiplikacija) postignuta je kod kontrolnog tretmana s baznim tipom eksplantata. MS hranjivi medij bez dodataka biljnih hormona te bazni tip eksplantata predstavljaju vrijedne smjernice za daljnja istraživanja u razvoju protokola za produkciju biomase ružmarina, proizvodnju sadnog materijala ili *in vitro* multiplikaciju. Daljnja istraživanja usmjeriti na ispitivanje učinka većih koncentracija hormona te primjena drugih citokinina i auksina, uključujući meta-Topolin (mT), koji je trenutno vrlo aktualan u istraživačkoj praksi.

## 9. SUMMARY

A study aimed at investigating the possibilities of micropropagation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in *in vitro* plant tissue culture conditions was conducted at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek during 2023. The research utilized MS nutrient medium with and without the addition of hormones BAP and IBA. The study examined the differences in productivity and morphological indicators between two types of explants (single shoots and basal type). After 30 days of culture, all treatments developed ideal biomass necessary for the evaluation of the research. Statistical analysis showed significant differences between the types of explants in the number of shoots and multiplication, while there were no significant differences in the number of lateral shoots, callus mass, and vegetative mass. The control treatment and the treatment with hormones on the basal type of explants resulted in the highest number of shoots. The highest number of lateral shoots was recorded in the hormone treatment that included single shoots type explants. The length of shoots and the number of leaves were greater in treatments with single shoots explants compared to basal explants. The highest productivity (multiplication) was achieved in the control treatment with basal type explants. The MS nutrient medium without the addition of plant hormones and the basal type explants represent valuable guidelines for further research in the development of protocols for the production of rosemary biomass, planting material, or *in vitro* multiplication. Further research should focus on examining the effects of higher concentrations of hormones and the application of other cytokinin and auxins, including meta-Topoline (mT), which is currently very relevant in research practice.

## 10. POPIS TABLICA

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablica 1.</b> Tablični pregled <i>in vitro</i> istraživanja na ružmarinu <i>R. officinalis</i> .....   | 13 |
| <b>Tablica 2.</b> Sastav MS hranjivog medija (Murashige i Skoog, 1962.).....   | 16 |
| <b>Tablica 3.</b> Prikaz tretmana i koncentracija u istraživanju.....  | 17 |
| <b>Tablica 4.</b> Rezultati mjerenja morfoloških i produktivnih parametara ružmarina na kontrolnom tretmanu (K).....   | 21 |
| <b>Tablica 5.</b> Rezultati mjerenja morfoloških i produktivnih parametara ružmarina na tretmanu s hormonima (T).....  | 23 |
| <b>Tablica 6.</b> Statističke razlike između tipova eksplantata u promatranim parametrima na razini cijelog pokusa, tretmanu s BAP + IBA (T) i kontrolnog tretmana (K- bez hormona)..... | 26 |

## 11. POPIS SLIKA

|   |    |
|---|----|
| <b>Slika 1.</b> <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....  | 2  |
| <b>Slika 2.</b> Komponente eteričnog ulja ružmarina ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....                              | 4  |
| <b>Slika 3.</b> Bljni materijal.....  | 15 |
| <b>Slika 4.</b> Disekcija <i>Rosmarinus officinalis</i> L. na a.) pojedinačne izdanke i b.) bazu.....                     | 17 |
| <b>Slika 5.</b> Pojedinačni izdanci i baze u hranjivom mediju.....  | 18 |
| <b>Slika 6.</b> Dinamika rasta kroz 30 dana kulture i završni eksplantat u mjerenju.....                                  | 18 |
| <b>Slika 7.</b> Dinamika rasta (30 dana) eksplantata (a. bazni i b. pojedinačni izdanci) na kontrolnom tretmanu (K).....  | 27 |
| <b>Slika 8.</b> Dinamika rasta (30 dana) eksplantata (a. bazni i b. pojedinačni izdanci) na tretmanu s hormonima (T)..... | 28 |

## 12. POPIS GRAFIKONA

**Grafikon 1.** Razlike između tretmana (K i T) i tipova eksplantata (baza i pojedinačni izdanci) u broju izdanaka (a) i broju lateralnih izdanaka (b).....24

**Grafikon 2.** Razlike između tretmana (K i T) i tipova eksplantata (baza i pojedinačni izdanci) u dužini izdanaka (a) i broju listova (b).....24

**Grafikon 3.** Razlike između tretmana (K i T) i tipova eksplantata (baza i pojedinačni izdanci) u multiplikaciji (produktivnosti).....25

**Grafikon 4.** Razlike između tretmana (K i T) i tipova eksplantata (baza i pojedinačni izdanci) u masi kalusa (a) i vegetativnoj masi (b).....25

# **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

---

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

Diplomski rad

## **MIKROPROPAGACIJA RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis* L.)**

Laura Lovrić

**Sažetak:** Istraživanje s ciljem ispitivanja mogućnosti mikropropagacije ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) u kulturi biljnog tkiva *in vitro* uvjetima provedeno je na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek tijekom 2023. godine. U istraživanju je korištena MS hranjiva podloga s i bez dodataka hormona BAP i IBA. Ispitivana je razlika u produktivnosti i morfološkim pokazateljima na dva tipa eksplantata (pojedinačni i bazni tip). Nakon 30 dana kulture svi tretmani razvili su idealnu biomasu potrebnu za evaluaciju istraživanja. Statistička analiza pokazala je značajne razlike između tipova eksplantata u broju izdanaka i multiplikaciji, dok u broju lateralnih izdanaka, masi kalusa i vegetativnoj masi nije bilo značajnih razlika. Kontrolni tretman i tretman s hormonima na baznom tipu eksplantata rezultirali su najvećim brojem izdanaka. Najveći broj lateralnih izdanaka zabilježen je kod tretmana s hormonima koji je uključivao eksplantate pojedinačnog tipa. Dužina izdanaka i broj listova bili su veći kod tretmana s pojedinačnim izdancima u odnosu na bazne eksplantate. Najveća produktivnost (multiplikacija) postignuta je kod kontrolnog tretmana s baznim tipom eksplantata. MS hranjivi medij bez dodataka biljnih hormona te bazni tip eksplantata predstavljaju vrijedne smjernice za daljnja istraživanja u razvoju protokola za produkciju biomase ružmarina, proizvodnju sadnog materijala ili *in vitro* multiplikaciju. Daljnja istraživanja usmjeriti na ispitivanje učinka većih koncentracija hormona te primjena drugih citokinina i auksina, uključujući meta-Topolin (mT), koji je trenutno vrlo aktualan u istraživačkoj praksi.

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

**Mentor:** dr.sc. Dejan Bošnjak

**Broj stranica:** 40

**Broj grafikona i slika:** 12

**Broj tablica:** 6

**Broj literaturnih navoda:** 37

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** ružmarin, mikropropagacija, eksplantat, hranjivi medij

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, predsjednik
2. dr.sc. Dejan Bošnjak, mentor
3. doc.dr.sc. Toni Kujundžić, član

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

# **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

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

**Graduate work**

## **MICROPROPAGATION OF ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.)**

Laura Lovrić

**Abstract:** A study aimed at investigating the possibilities of micropropagation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in in vitro plant tissue culture conditions was conducted at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek during 2023. The research utilized MS nutrient medium with and without the addition of hormones BAP and IBA. The study examined the differences in productivity and morphological indicators between two types of explants (single shoots and basal type). After 30 days of culture, all treatments developed ideal biomass necessary for the evaluation of the research. Statistical analysis showed significant differences between the types of explants in the number of shoots and multiplication, while there were no significant differences in the number of lateral shoots, callus mass, and vegetative mass. The control treatment and the treatment with hormones on the basal type of explants resulted in the highest number of shoots. The highest number of lateral shoots was recorded in the hormone treatment that included single shoots type explants. The length of shoots and the number of leaves were greater in treatments with single shoots explants compared to basal explants. The highest productivity (multiplication) was achieved in the control treatment with basal type explants. The MS nutrient medium without the addition of plant hormones and the basal type explants represent valuable guidelines for further research in the development of protocols for the production of rosemary biomass, planting material, or in vitro multiplication. Further research should focus on examining the effects of higher concentrations of hormones and the application of other cytokinin and auxins, including meta-Topoline (mT), which is currently very relevant in research practice.

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

**Mentor:** dr.sc. Dejan Bošnjak

**Number of pages:** 40

**Number of figures and pictures:** 12

**Number of tables:** 6

**Number of references:** 37

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** rosemary, micropropagation, explants, nutrient medium

### **Reviewers:**

1. Aleksandar Stanisavljević, Ph.D., full.prof, president
2. Dejan Bošnjak, Ph.D., mentor
3. Toni Kujundžić, asst.prof., member

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