

Mikropropagacija borovnice (*Vaccinium Corymbosum* L.) in vitro

Milaković, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:151:608340>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



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

Ivona Milaković

Preddiplomski sveučilišni studij

Hortikultura

Mikropropagacija borovnice (*Vaccinium Corymbosum L.*) *in vitro*

Završni rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivona Milaković

Preddiplomski sveučilišni studij

Hortikultura

**Mikropropagacija borovnice (*Vaccinium Corymbosum L.*) in
*vitro***

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

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

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij, smjer Hortikultura

Završni rad

Mikropropagacija borovnice (*Vaccinium corymbosum L.*) *in vitro*

Ivona Milaković

Sažetak: Borovnica (*Vaccinium L.*) pripada voćnoj vrsti čiji je intenzivni uzgoj započeo dosta kasno, odnosno u RH nema veliku tradiciju uzgoja. Uslijed politike poticanja malih poljoprivrednih gospodarstava, odnosno subvencijama europskih fondova polako dolazi do povećanja površina pod intenzivnom proizvodnjom borovnice. Sve je veći interes mladih proizvođača koji uslijed uvida u loše stanje po pitanju otkupne cijene nekog drugog voća ulažu svoja sredstva upravo u podizanje novih nasada pod borovnicom. Posljedica svega navedenog je i potreba, odnosno povećana potražnja proizvođača za certificiranim i zdravim sadnim materijalom. U voćarskoj i rasadničarskoj proizvodnji RH kronično je aktualan problem nedostatka visoko kvalitetnog reprodukcijaskog sadnog materijala (uvoz, sivo tržište, zdravstveno neispravan materijal upitne kvalitete). Suvremena znanstvenoistraživačka praksa razvijenih zemalja EU u produkciji specijaliziranih i strateških biljnih kultura u potpunosti se temelji na uporabi suvremenih biotehnoških metoda. *In vitro* mikropropagacija kulturom tkiva osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog biljnog materijala u vrlo kratkom vremenskom intervalu neovisno od klimatskih uvjeta. Ovaj završni rad strukturiran je na način da ukaže na važnost proizvodnje borovnice kulturom tkiva, dosadašnje spoznaje, dostignuća i modele, te budućnost i perspektivu mikropropagacije borovnice *in vitro* tehnikom.

Ključne riječi: borovnica, mikropropagacija, *in vitro*, hranjivi medij, hormoni

33 stranica, 3 tablice, 25 grafikona i slika, 83 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Horticulture

BSc Thesis

Micropropagation of blueberries (*Vaccinium corymbosum L.*) *in vitro*

Ivona Milaković

Summary: Blueberry (*Vaccinium L.*) belongs to a fruit species whose intensive cultivation started very late and does not have a large breeding tradition in the Republic of Croatia. Due to the policy of encouraging small farms, i.e. subsidies from European funds, the area under intensive blueberry production is slowly increasing. The interest of young producers is growing because of the insight into the poor situation regarding the purchase price of other fruits, and they want to invest their money in blueberry plantations. The consequence of all the above is the need, increased demand of producers for certified and healthy planting material. In the fruit and nursery production of the Republic of Croatia is a chronically problem of the lack of high quality reproductive planting material (import, gray market, defective material and questionable quality). The modern scientific and research practice of the developed EU countries in the production of specialized and strategic crops is entirely based on the use of modern biotechnological methods. Micropropagation by tissue culture ensures high quality and phytosanitary plant material obtained in a very short time interval and independent of climatic conditions. This graduated work is structured to point out the importance of blueberry production by tissue culture, current knowledge, achievements and models, and the future and perspective of blueberry micropropagation by *in vitro* technique.

Keywords: blueberry, micropropagation, *in vitro*, nutrient medium, hormones

33 pages, 3 tables, 25 figures, 83 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. MATERIJAL I METODE	2
3. REZULTATI I RASPRAVA	3
3.1. Američka visokogrmolika borovnica (<i>Vaccinium corymbosum L.</i>).....	4
3.1.1. Karakteristike.....	5
3.1.2. Sortiment.....	7
3.1.3. Nutritivne vrijednosti.....	8
3.1.4. Ljekovita svojstva.....	9
3.2. Mikropropagacija borovnice.....	10
3.2.1. Prednosti i nedostaci mikropropagacije.....	11
3.2.2. Faze mikropropagacije.....	13
3.2.3. Kultura pojedinačnih nodija.....	14
3.2.4. Metoda aksilarnog pupanja.....	15
3.3. Dosadašnja istraživanja mikropropagacije borovnice <i>in vitro</i>	17
3.3.1. Aksilarno pupanje borovnice <i>in vitro</i>	17
3.3.2. Regeneracija adventivnih izdanaka borovnice <i>in vitro</i>	21
3.3.3. Rizogeneza/ukorjenjivanje i aklimatizacija borovnice.....	22
3.3.4. Suvremena proizvodnja borovnice <i>in vitro</i> na tekućoj podlozi – TIS bioreaktori....	23
4. ZAKLJUČAK	26
5. POPIS LITERATURE	28

1. UVOD

Borovnica (*Vaccinium L.*) pripada voćnoj vrsti čiji je intenzivni uzgoj započeo dosta kasno, odnosno u RH nema veliku tradiciju uzgoja. Jedan od ograničavajućih faktora intenzivnog uzgoja borovnice u Hrvatskoj su neadekvatni agroekološki uvjeti na mnogim lokalitetima. Svjetskim tržištem dominiraju SAD i Kanada koje danas drže više od 80% svjetske proizvodnje. Posjeduje visoku nutritivnu vrijednost, a posljednjih godina putem raznih medija podiže se svijest potrošačima o vrijednosti borovnice po pitanju ljudskog zdravlja. Često borovnicu predstavljaju kao funkcionalna hrana, odnosno „supervoće“ koje ima vrlo povoljan učinak na ljudsko zdravlje. Uslijed politike poticanja malih poljoprivrednih gospodarstava, odnosno subvencijama europskih fondova polako dolazi do povećanja površina pod intenzivnom proizvodnjom borovnice. Sve je veći interes mladih proizvođača koji uslijed uvida u loše stanje po pitanju otkupne cijene nekog drugog voća ulažu svoja sredstva upravo u podizanje novih nasada pod borovnicom. Borovnica još uvijek drži dobru otkupnu cijenu u odnosu na neko drugo voće, ali je pitanje da li će ta visoka cijena bobica biti vječnog karaktera.

Posljedica svega navedenog je i potreba, odnosno povećana potražnja proizvođača za certificiranim i zdravim sadnim materijalom. U voćarskoj i rasadničarskoj proizvodnji RH kronično je aktualan problem nedostatka visoko kvalitetnog reprodukcijskog sadnog materijala (uvoz, sivo tržište, zdravstveno neispravan materijal upitne kvalitete).

Suvremena znanstvenoistraživačka praksa razvijenih zemalja EU u produkciji specijaliziranih i strateških biljnih kultura u potpunosti se temelji na uporabi suvremenih biotehnoloških metoda. *In vitro* mikropropagacija kulturom tkiva osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog biljnog materijala u vrlo kratkom vremenskom intervalu neovisno od klimatskih uvjeta.

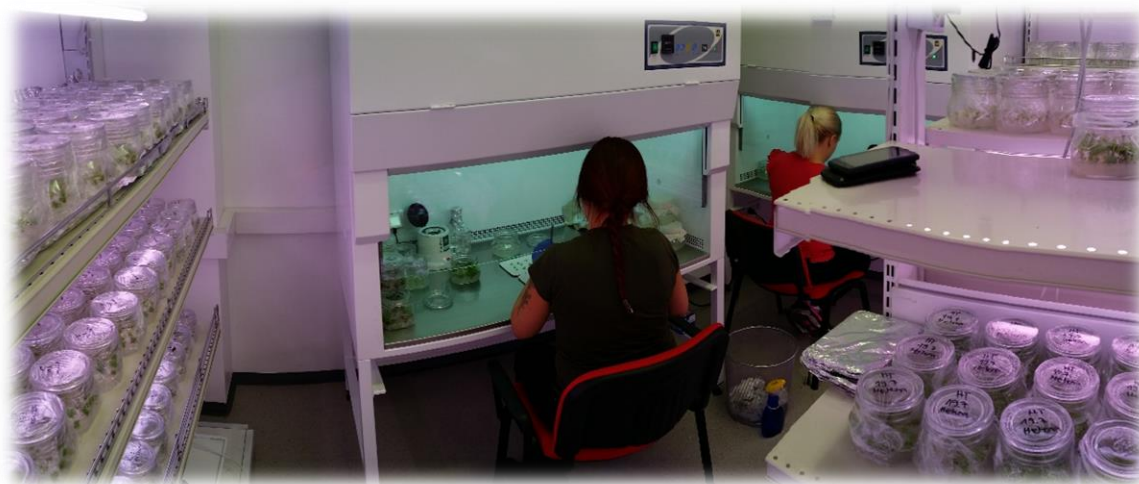
U prvom dijelu rada obradom podataka kroz raspravu detaljno je opisana borovnica, njene morfološke karakteristike, sortiment, ljekovitost i nutritivne vrijednosti sve do glavnog dijela i teme ovoga završnog rada o razmnožavanju borovnice mikropropagacijom, odnosno kulturom tkiva *in vitro*.

Cilj ovoga rada zamišljen je poput objedinjenja više relevantnih stručnih izvora na ovu temu. Strukturiran je na način da ukaže na važnost proizvodnje borovnice kulturom tkiva, dosadašnje spoznaje, dostignuća i modele, te budućnost i perspektivu mikropropagacije borovnice *in vitro* tehnikom.

2. MATERIJAL I METODE

Za uspješnu izradu ovog završnog rada bilo je potrebno temeljito prikupiti, istražiti i proučiti dostupnu literaturu i podatke vezane za mikropropagaciju borovnice. Dostupna literatura različitih autora usko vezana za kulturu tkiva borovnice u Hrvatskoj je na žalost dosta oskudna. Analizirani su i strani stručni i znanstveni časopisi, razne internetske stranice i dostupni interni podaci s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* – laboratorij za voćarstvo). Kako bi ovaj završni rad bio što realniji i u skladu sa stvarnošću, pri izradi ovoga rada uvelike je pridonio posjet gore navedenom laboratoriju i razgovori s mentorom kojemu je područje interesa upravo *in vitro* tehnologija. U sklopu laboratorija vrše se mnoga *in vitro* istraživanja na raznim voćnim vrstama (malina, orah, borovnica, paulovnja, lijeska, vegetativne podloge za trešnju, višnja, goji, itd.). Katedra se bavi znanstvenim istraživanjem (razvijanje i poboljšanje protokola u cilju razvoja oplemenjivačkog i selekcijskog rada u voćarstvu), edukacijom studenata, proizvodnjom sadnog materijala i sekundarnih metabolita. Laboratorij posjeduje svu opremu potrebnu za uspješno provođenje mikropropagacije (laminarni stol/kabinet, autoklav, miješalica, pH metar, sterilizator, pincete, skalpeli, teglice, TIB SETIS® sustav bioreaktora, itd.), matični biljni materijal (matičnjak – prijavljen u centru za rasadničarstvo HAPIH), prostor za aklimatizaciju, klima komoru s kontroliranim uvjetima potrebnim za razvoj biljaka u pojedinim fazama mikropropagacije (Slika 1.).

U ovom završnom radu pažljivo su analizirana dosadašnja istraživanja, opisane faze i ključni segmenti u kulturi tkiva borovnice kako bi ovaj rad dao što pregledniju, opravdaniju i realniju sliku u *in vitro* mikropropagaciju borovnice.



Slika 1. Laboratorij za kulturu tkiva – voćarstvo FAZOS (Foto: Milaković, 2019.)

3. REZULTATI I RASPRAVA

Rod *Vaccinium L.* član je porodice *Ericaceae*, a sadrži oko 400 različitih vrsta od kojih je bar jedna ili više vrsta autohtono na svakom kontinentu, osim Antarktike i Australije (Vander Kloet, 1988.; Ballington, 2001.) Najveće površine nasada borovnice nalaze se u SAD-u i Kanadi čija proizvodnja iznosi 80% od ukupne svjetske proizvodnje ovoga voća, a slijede ih Europa, Australija, Čile te Novi Zeland što je slikovito prikazano na Slici 2.

U Hrvatskoj su prisutne četiri vrste a to su obična borovnica (*V. myrtillus M.*), brusnica (*V. vitis-idaea L.*), močvarna borovnica (*V. uliginosum L.*) koje su ujedno i autohtone vrste a američka borovnica (*V. corymbosum L.*) je kultivirana vrsta. Vrste roda *Vaccinium L.* vole propusna i dosta kisela tla ($\text{pH} < 5$) koja su bogata organskom tvari. Možemo ih pronaći u dobro osvijetljenim šumama, uz rubove šuma ili na otvorenim prostorima koji zadovoljavaju navedene uvijete i imaju dovoljnu količinu Sunčeve svjetlosti (Dujmović-Purgar i sur., 2007.).

Mnogi autori bavili su se botaničkim opisom, ljekovitošću, kakvoćom te uzgojem vrsta roda *Vaccinium L.* koji su detaljnije opisani u sljedećim izvorima (Gelenčir, 1987.; Gelenčir i Gelenčir, 1991.; Dubravec i Dubravec, 1998.; Mindel, 1998.; Miljković, 2006.). Sve vrste ovoga roda prvenstveno se uzgajaju radi ploda koji je bobica veoma ljekovitih svojstava a njihov okus varira od bljutavog pa do gorkoga i opornoga te slatkoga ovisno o sorti . Plodovi sadrže relativno visok sadržaj vitamina C, celuloze i pektina te antocijanina (Stark, Hall i Hendrickson, 1978.; Sapers i Hargrave, 1987.; Hong i Wrolstad, 1990.) koji ima važna terapijska i ljekovita svojstva na čovjekov organizam, uključujući i ona antitumorska (Koide i sur., 1996.), pomažu u otklanjanju čireva (Cristoni i Magistretti, 1987.) te antioksidativna svojstva i protuupalno djelovanje (Wang i sur., 1999.).



Slika 2. Područja s najvećom proizvodnjom borovnice

Izvor: <https://www.ferreiroandcompany.com/fruits/blueberry.php>

3.1. Američka visokogrmolika borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.)

Najčešće uzgajane odnosno kultivirane vrste borovnica, razvijene su od sjevernoameričkih vrsta iz skupine visokogrmolikih borovnica (Highbush Blueberry): *Vaccinium corymbosum* L.; iz skupine borovnica „zečje oko“ (Rabbiteye Blueberry): *Vaccinium ashei* R.; iz skupine južnjačkih visokogrmolikih borovnica (Southern Highbush Blueberries): *Vaccinium australe* S.; iz skupine niskogrmolikih borovnica (Lowbush Blueberries): *Vaccinium angustifolium* A., *Vaccinium myrtilloides* M. (Lyrene, 1990.)



Slika 3. Višegodišnji grm *Vaccinium corymbosum* L.

Izvor: <https://www.flickr.com/photos/138014579@N08/36611026286/in/photostream/>

Budući da su genetski heterozigotne, *Vaccinium* L. vrste ne reproduciraju pojedince iz sjemena koji su slični roditeljima i nose sve njihove kvalitete odnosno one se ne razmnožavaju u komercijalne svrhe iz sjemena već vegetativnim putem što osigurava da željeni genetski materijal ostane očuvan te garantira visok prinos. Autohtone vrste roda *Vaccinium* L. su diploidi sa somatskim brojem kromosoma ($2n = 24$) a kod kultiviranih vrsta pojavljuju se tetraploidi i heksaploidi. *Vaccinium corymbosum* L. je tetraploid a jedna od sorata prikazana je na Slici 4. (Morrison i sur., 2000.).

Uzgoj vrsta iz skupine visokogrmolikih borovnica u Europi je započeo nakon 1920. godine u Nizozemskoj te se počeo širiti u Poljskoj i Njemačkoj gdje su prvi put predstavljene sorte nastale križanjem europskih sa sjevernoameričkim genotipovima (Pliszka, 1997.).

Danas se uzgoj visokogrmolikih sorti proširio po cijeloj Europi a najveći površine nasada ove kulture nalaze se u Njemačkoj, Poljskoj, Francuskoj, Nizozemskoj, Latviji, Rumunjskoj, Italiji i Španjolskoj.



Slika 4. Visokogrmolika sorta *Vaccinium corymbosum* L. „Bluecrop“

Izvor: https://plants.connon.ca/11100004/Plant/1553/Bluecrop_Blueberry

3.1.1. Karakteristike

Američka ili kultivirana borovnica je višegodišnji drvenasti grm prikazan na Slici 3. a kao biljna vrsta izrazito je acidofilna biljka koja najbolje uspijeva na humusnim, prozračnim tlima sa dobrim vodno-zračnim odnosom uz pH vrijednosti 3,5 - 5,2 (optimalno 4,3 - 4,8). Potrebna im je dovoljna i konstantna količina vlage ali pri uzgoju i odabiru zemljišta treba izbjegavati ona sa visokom razinom podzemne vode i zemljišta sa stajaćim vodama.

Korijenov sustav *Vaccinium corymbosum* L. je plitak, vlaknast i gusto isprepleten a glavna sustava je na dubini od 35-45 cm. Većinom se sade na grebene koji su visine do 30 cm i na taj način navodnjavanjem se kontroliraju i poboljšavaju vodno-zračna svojstva tla a samim time i sprječavaju potencijalne bolesti korijenovog sustava. Da bi se dugoročno smanjila pH vrijednost, onemogućila ili smanjila pojava korova te tijekom visokih ljetnih temperatura smanjio gubitak vlage iz tla, grebeni se pokrивaju odnosno malčiraju sa usitnjenim drvenim ostatcima (najčešće piljevinom crnogoričnih ili igličastih vrsta).

U razvojnem ciklusu najosjetljivije razdoblje traje od otvaranja pupova početkom travnja do stadija zelenih razvijenih plodova krajem mjeseca svibnja pa tijekom toga razdoblja temperatura i hraniva imaju najveći izravan utjecaj na kvalitetu i količinu prinosa.

Cvjetovi su joj je bijele boje što se vidi na Slici 5., zvonolikog su oblika, veličine do 10 milimetara a pojavljuju se u travnju. Od pojave cvjetova pa do sazrijevanja potreban je vremenski period od 60-80 dana, ovisno o klimatskim uvjetima.



Slika 5. *Vaccinium corymbosum* L. - bijeli cvjetovi

Izvor:https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium_corymbosum,_by_Mary_Vaux_Walcott.jpg

3.1.2. Sortiment

Raznolike sorte borovnica odlikuju se različitim karakteristikama izgleda ploda i grma, vremena dozrijevanja te rodnošću. U Hrvatskoj najbolje uspijevaju visokogrmolike sorte borovnica a neke od njih su prikazane na Slikama 4., 6., 7. i 8. koje se dijele u nekoliko grupa s obzirom na vrijeme sazrijevanja pa tako postoje:

- Sorte ranog sazrijevanja: *Duke*, *Huron*, *Draper*, *Bluetta* (Slika 6.).



Slika 6. *Vaccinium corybosum* L. „*Bluetta*“

Izvor: http://www.pepiniere-bretagne.fr/detail-article.php?ID_ARTICLE=9813

- Sorte srednje ranog sazrijevanja: *Blueray*, *Bluecrop* (Slika 4.), *Berkeley* (Slika 7.), *Hardy Blue*.



Slika 7. *Vaccinium corymbosum* L. „*Berkeley*“

Izvor: <https://www.americanmeadows.com/perennials/berries/blueberry-bushes/blueberry-berkeley>

- Sorte kasnijega sazrijevanja: *Coville*, *Herbert* (Slika 8.), *Jersey*, *Elliot*, *Aurora*, *Liberty*.



Slika 8. *Vaccinium corymbosum L.* „Herbert“

Izvor: <https://www.primrose.co.uk/1ft-herbert-blueberry-bush-pot-p-68575.html>

3.1.3. Nutritivne vrijednosti

Energetska vrijednost *Vaccinium corymbosum L.* na 100 grama iznosi 56 kcal, a sadrži vode u težinskom omjeru 84,6 g, proteina 0,7 g, ugljikohidrata 14,2 g, ukupne masti 0,4 g te vlakna 2,7g. Detaljniji nutritivni sastav prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Nutritivni sastav *Vaccinium corymbosum L.*

Izvor: <https://nutricionizam.com/borovnica/>

Minerali	Vitamini
Kalcij – 6 mg	Vitamin C – 13 mg
Željezo – 0,17 mg	Tijamin – 0,048 mg
Magnezij – 5 mg	Riboflavin – 0,05 mg
Fosfor – 10 mg	Nijacin – 0,36 mg
Kalij – 89 mg	Pantotenska kiselina – 0,09 mg
Natrij – 6 mg	Vitamin B6 – 0,036 mg
Cink – 0,11 mg	Folat – 6,4 mcg
Bakar – 0,06 mg	Vitamin A – 100 IU
Mangan – 0.28 mg	
Selen – 0.6 mcg	

3.1.4. Ljekovita svojstva

Ono što borovnicu čini posebnom i izdvaja od drugih vrsta voće je izrazito visoka količina antioksidanta koji služe kao glavni neutralizatori slobodnih radikala u tijelu. Superiorna antioksidativna svojstva ima zahvaljujući bogatom sastavu flavona, antocijana, flavonoida i terpena.

Borovnice štite mozak od oksidativnog stresa te poboljšavaju koncentraciju i pamćenje, djeluju protiv infekcija urinarnog traka, imaju antikancerogeno djelovanje, smanjuju razinu lošeg (LDL) kolesterola, potiču rad crijeva, djeluju na cirkulaciju i širenje krvnih žila te cijeli krvožilni sustav, protiv dijabetesa (Slika 9.), djeluju na jačanje kostiju i zdrav izgled kože (Ware, 2017.; Leech, 2018.).



Slika 9. Čaj od borovnice – koristi se u liječenju dijabetesa, podizanju imuniteta, poboljšanju probave

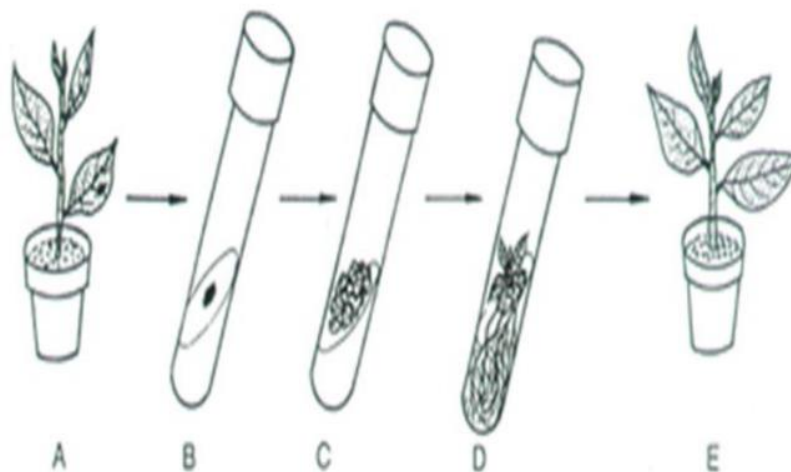
Izvor: <https://hr.crunchcompass.com/zdaroye-i-harchavanne/610-lyachebnyya-ylascivasciyagad-charnicy-narodnyya-recepty/>

3.2. Mikropropagacija borovnice

Mikropropagacija je metoda vegetativnog načina razmnožavanja na umjetno stvorenoj hranidbenoj podlozi u aseptičnim uvjetima *in vitro* pod kontroliranim okolnostima uzgoja. Tradicionalno se za razmnožavanje koriste reznice od mekog, tvrdog ili polutvrdog drveta. Kloniranje metodom mikropropagacije je puno zahtjevanije i kompliciranije ali je isto tako potencijalno efektivnija metoda za poboljšanje kvalitete i količine prinosa, uvjeta uzgoja te dobivanje zdravih i bezvirusnih presadnica (Morrison i sur., 2000.).

Razmnožavanje kulturom tkiva je postupak koji podrazumijeva rast vrlo sitnih organa *in vitro*, koji su naziv dobili prema organu ili tkivu koje uvodimo u kulturu. Sam naziv kultura *in vitro* znači kultura u staklu, jer se kulture drže u staklenim ili prozirnim posudicama. Ovakav način razmnožavanja naziva se mikropropagacija jer su organi ili cijele biljke u odnosu na generativnu proizvodnju umanjene veličine i u početku procesa vidljivi su minijturni izdanci i biljčice (Slika 10.).

Ovaj postupak osigurava vrlo brz proces dobivanja velikog broja biljaka koje su istovjetne po genetičkom potencijalu, rastu i razvoju vrste. Mikropropagacija je zapravo proces kloniranja jer sve dobivene biljke predstavljaju matične kopije multipliciranog majčinskog uzorka (Međedović i Ferhatović, 2003.).



Slika 10. Razmnožavanje kulturom tkiva – A (majčinska biljka), B (eksplantat u agar mediju), C (rast kalusa), D (regeneracija biljke), E (biljka prenesena u sterilnu zemlju)

Izvor: <https://slideplayer.com/slide/6016339/>

3.2.1. Prednosti i nedostaci mikropropagacije

Prednosti mikropropagacije u odnosu na tradicionalno vegetativno razmnožavanje su:

- Proces razmnožavanja *in vitro* brži je od razmnožavanja *in vivo*.
- Mogućnost razmnožavanja biljaka koje u uvjetima *in vivo* nije moguće razmnožavati.
- Biljke nastale u uvjetima *in vitro* su zdrave, bez virusa i patogena.
- Potrebno je vrlo malo početnog materijala koji je selekcioniran i izdvojen.
- Znatna energetska ušteda (grijanje staklenika).
- Proizvodnja kroz čitavu godinu neovisno o godišnjem dobu.
- Važnost za očuvanje genetskog materijala u bankama sjemena.



Slika 11. Laboratorij za mikropropagaciju FAZOS (Foto: Milaković, 2019.)

Nedostatci mikropropagacije su:

- Genetička stabilnost u nekim je sustavima razmnožavanja niska (adventivnim izdancima i somatskim embrijima u kulturi kalusa).
- Prijenos biljaka u uvijete *in vivo* kod nekih je biljnih vrsta zahtjevno i teško.
- Relativno visoka cijena opremanja laboratorija za mikropropagaciju *in vitro* (Slika 11.).
- Regenerativna sposobnost može se izgubiti nakon određenog broja supkultura kalusnog tkiva ili stanica.

Presadnice u uvjetima *in vitro* mogu se stvarati na tri načina i to poticanjem rasta aksilarnih pupova, stvaranjem adventivnih izdanaka te somatskom embriogenezom. Metode za kloniranje biljaka *in vitro* su pojedinačni nodijalni segmenti (Slika 12), aksilarno grananje i regeneracija adventivnih organa (korijena i izdanaka) na eksplantatima (Jelaska, 1994.).

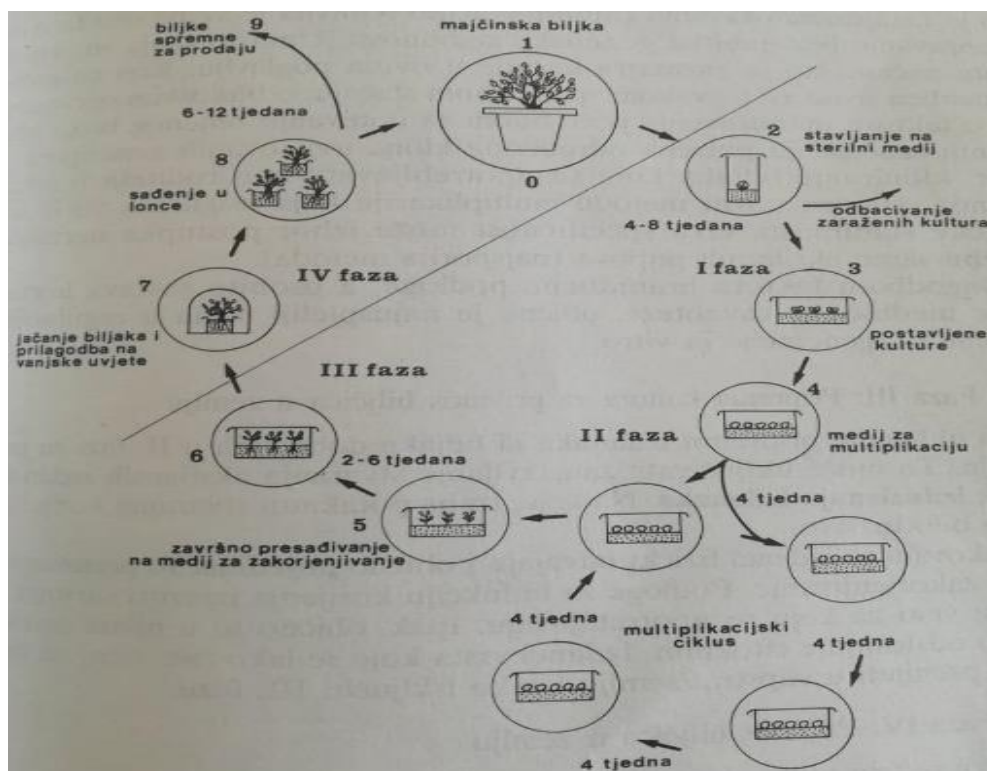


Slika 12. Borovnica u multiplikaciji - nodijalni segmenti FAZOS (Foto: Milaković, 2019.)

3.2.2. Faze mikropropagacije

Mikropropagacija kao način vegetativnog razmnožavanja sastoji se od nekoliko međusobno povezanih faza (Slika 13.), a to su :

0. **Nulta faza ili postupci prije kulture-** obuhvaća sve postupke prije kulture *in vitro*, odabir majčinske biljke i tkiva od kojeg će biti uzet eksplantat te njegovo očuvanje.
1. **Faza I. ili uvođenje u kulturu (inicijacija)** – obuhvaća sterilnu izolaciju meristema, vegetacijskog vrška, eksplantata, a cilj je zdrav i sterilan rast eksplantata.
2. **Faza II. ili umnožavanje (multiplikacija)** – svrha ove faze je postići razmnožavanje bez gubitka genetičke stabilnosti. Prilagodba sastava hranidbene podloge je najsigurniji način regulacije multiplikacije i regeneracije *in vitro* kako bi osigurali zdrav rast i razvoj eksplantata.
3. **Faza III. ili pripremanje kultura za prijenos biljaka u zemlju** – uključuje zaustavljanje stvaranja aksilarnih izdanaka i početak izduživanja izdanaka kako bi se izdanci ili biljke dobivene u fazi II. pripremile za prijenos u zemlju.
4. **Faza IV. ili prijenos biljaka u zemlju** – biljke se prenose u zemlju i prilagođavaju se na rast u vanjskim uvjetima (Jelaska, 1994.).



Slika 13. Faze u mikropropagaciji *in vitro* i njihovo vremensko trajanje

Izvor: S. Jelaska (1994.)

3.2.3. *Kultura pojedinačnih nodija*

Ovo je najprirodnija metoda vegetativnog razmnožavanja biljaka *in vitro* jer se primjenjuje *in vivo*. Pod pojmom kultura pojedinačnih nodija podrazumijevamo izolaciju pupa zajedno s komadićem pripadajuće stabljike kako bi se potakao razvitak izdanaka. Svaki pup koji se nalazi u pazušcu lista a također i vršni mogu se odvojiti od biljke i kultivirati na hranidbenoj podlozi radi poticanja njegovog razvoja u izdanak, a taj proces obavlja se u laminaru (Slika 14.) koji osigurava sterilne uvijete tijekom čitavog procesa. Pupovi koji se nalaze u pazušcima listova novoformirane stabljike ponovno mogu biti subkultivirani za ponovno nastajanje stabljika iz njih i ovaj postupak se može kontinuirano ponavljati. Kada se dobije dovoljan broj izdanaka oni se trebaju ukorijeniti te se prenose u zemlju (Jelaska, 1994.).



Slika 14. Laminarni kabinet FAZOS (Foto: Milaković, 2019.)

Izdvajanje pupova i vegetacijskog vrška tehnika je koja ne traži dodavanje citokinina radi prekida apikalne dominacije. Da bi se smanjila mogućnost infekcije materijala, preporučuje se izolacija zatvorenih pupova no ako postoji endogena infekcija, onda je ova metoda beskorisna i potrebno je najprije postaviti kulturu meristema. Stopa razmnožavanja ovisi o broju raspoloživih pupova pa ako je njihov broj manji razmnožavanje je sporije. Što se više listova zametne u jedinici vremena, više će pupova biti na raspolaganju i razmnožavanje će biti brže (Jelaska, 1994.).

Postupci za prekid dormance nakon izolacije *in vitro*, posebno za drvenaste kulture, jesu niska temperatura (0-5°C), dugi dan (16 sati osvjetljenja) te proces djelovanja niske temperature kojemu slijedi postupak dugog dana. U nekim slučajevima giberelini i/ili

citokinini te etioliranje (rast u tami ili na svjetlu niskog intenziteta) mogu izazvati prekid dormance u pupovima (Jelaska, 1994.). Juvenilni izdanci kod drvenastih vrsta rastu brže od odraslih, koje zato treba rejuvenilizirati ili posebnim postupcima pojačati vigoroznost (Pierik, 1990.).

3.2.4. Metoda aksilarnog pupanja

Jelaska (1994.) navodi kako je metoda aksilarnog pupanja slična metodi pojedinačnih nodija, a najveća razlika je u tome što se kod metode pojedinačnih nodija primjenjuje isključivo izduživanje stabljike te dodavanje citokinina nije potrebno ili u vrlo malim koncentracijama. Metodom aksilarnog pupanja vegetacijski se vršak izolira i na podlozi s relativno visokom koncentracijom citokinina inducira se rast aksilarnih pupova u pazušcima listova. Visoka koncentracija citokinina poništava apikalnu dominaciju i dozvoljava razvoj aksilarnih pupova (Slika 15.). Kada se izdanci razvijaju prenose se na svježiju podlogu. i postupak se ponavlja dok se ne dobije dovoljan broj izdanaka koji se nakon toga ukorjenjuju i prenose u zemlju.



Slika 15. Eksplantat *Vaccinium corymbosum* L., „Legacy“ u hranidbenoj podlozi FAZOS (Foto: Milaković, 2019.)

Metoda aksilarnog pupanja često se kombinira sa metodom pojedinačnih nodija pogotovo kod biljaka kod kojih je sterilna izolacija katkad vrlo teška. U takvim slučajevima, izolira se što je moguće manji vegetacijski vršak i to daje veću mogućnost da eksplantat bude sterilan. Svu opremu i materijale koji se koriste u mikropropagaciji potrebno je prije upotrebe sterilizirati u autoklavu (Slika 16.), uređaju koji pomoću vodene pare i tlaka sterilizira iznad točke vrelišta, ovisno o kojem materijalu se radi. Ako postoji unutrašnja infekcija potrebno je započeti s kulturom meristema. Da bi se osiguralo da eksplantat bude sterilan i oslobođen svih mikroorganizama vegetacijski se vršak reže po duljini i inokulira položeno na podlogu bogatu hranjivim tvarima i na taj se način unutrašnja infekcija utvrđuje jer se klice brzo razmnože (Jelaska, 1994.).



Slika 16. Autoklav FAZOS (Foto: Milaković, 2019.)

Razrezani vršak može uginuti tako da se ova metoda ne bi trebala primjenjivati ako postoji samo ograničena količina početnog materijala. U kulturi meristema odraslih biljaka može doći do rejuvenilizacije nakon određenog broja subkultiviranja odnosno rasta u kulturi *in vitro*. Takva rejuvenilizacija je ista ili slična rejuvenilizaciji (djelomičnoj) *in vivo*, kada se uzimaju „reznice sa reznice“. Stupanj rejuvenilizacije ovisi o vremenu u kulturi, veličini meristema i dodanim hormonima u hranidbenoj podlozi a isto tako i stopa razmnožavanja aksilarnim izdancima nije postojana već će ovisiti o broju supkultura; što je broj supkultura veći, rejuvenilizacija će biti brža (Jelaska, 1994.).

Prednosti metode aksilarnog grananja za voćarsku proizvodnju navodi Jelaska (1994.), a one su sljedeće:

1. Brzo razmnožavanje novih podloga i sorti te postavljanje zdravog materijala.
2. Razmnožavanje sorti s vlastitim korijenskim sustavom isključuje cijepljenje čime se smanjuju troškovi radnog vremena.
3. Razmnožavanje *in vitro* može smanjiti rasipanje materijala što se javlja kada je cijepljenje neuspješno. Međutim, rasipanje materijala može se dogoditi i u mikrorazmnožavanju ako prijenos biljnog materijala u zemlju nije uspješan.
4. Razmnožavanje ne ovisi o sezoni i omogućuje čuvanje biljnog materijala pri niskim temperaturama do trenutka sadnje.

3.3. Dosadašnja istraživanja mikropropagacije borovnice *in vitro*

Borovnice su raznolika skupina višegodišnjeg, grmolikog, većim dijelom listopadnog bilja, koje stvaraju plodove u grozdovima. Trenutno se u svijetu komercijalno uzgaja pet glavnih skupina borovnica: (1) niskogrmolike (*V. angustifolium* Ait., *V. myrtilloides* Michx., *V. boreale* Hall i Aald.); (2) visokogrmolike (*V. corymbosum* L.); (3) polu-visoki grm, grmovi koji su hibridi povratne hibridizacije visokogrmolike i niskogrmolike; (4) južne visokogrmolike koje su razvijene hibridizacijom *V. corymbosum* L s jednom ili više vrsta (uglavnom *V. Darrowi* Camp i *V. ashei* Reade; Lyrene 1990.); i (5) „rabbiteye“ zečje oko (*V. Ashei* R.).

3.3.1. Aksilarno pupanje borovnice *in vitro*

Iako su Barker i Collins (1963.) uzgajali rizome niskogrmolike borovnice na Whiteovom (1943.) mediju bez dodatka regulatora za rast, *in vitro* razmnožavanje vrsta *Vaccinium* pokrenula je Lyrene (1978.), a slijede ju Cohen i Elliot (1979.). Potom su razvijene tehnike kulture tkiva za proliferaciju aksilarnih izdanaka niskogrmolikih kultivara (Frett i Smagula, 1983.; Brisette i sur., 1990.; Debnath, 2004.), visokogrmolikih (Cohen, 1980.; Zimmerman i Broome, 1980.; Wolfe i sur., 1983.; Grout i Reed, 1986.; Eccher i Noe, 1989.; Noe i Eccher, 1994.; Gonzalez i sur., 2000.) i „rabbiteye“ zečje oko (Lyrene, 1980.). Nekolicina preglednih radova (Smagula i Lyrene, 1984.; George i sur., 1987.; Zimmerman, 1991.; Galletta i Ballington, 1996.; Debnath, 2003a.; Rowland i Hammerschlag, 2005.) sažela je *in vitro*

kulturu borovnice. Većina navedenih oblika mikropropagacije uključuje neku metodu meristemske kulture, gdje se koriste segmenti stabljike koji sadrže ili apikalne ili bočne pupoljke kao izvorni tkivo - eksplantat. Glavni problem u mikropropagaciji borovnice je stvaranje neželjenog kalusa u bazi eksplantata i pojava spontanih adventivnih izdanaka (Zimmerman i Broome, 1980.; Litwińczuk i Szczerba, 1998.).

Kultura izdanaka može se inicirati iz nodijalnih segmenata ili iz vegetacijskog vrška. Eksplantati nastali od juvenilnih biljaka donora su pogodniji za proliferaciju od onih koji nisu prošli juvenilni stadij (Lyrene, 1980.). Odrvenjele reznice sa starijih borovnica, sakupljene su u zimi, površinski su sterilizirane i čuvane na niskoj temperaturi. Pojava pupoljaka stimulirana je stavljanjem reznica u vodu pri 26 °C +/- 2 °C (20 °C +/- 2 °C noćna temperatura) i fotoperiodom od 16 sati tijekom 15 dana. Potom se upotrebljavaju bočni izdanci kao izvor eksplantata. Poluodrvjenjele reznice sakupljene u proljeće s matičnih biljaka uzgajanih u polju (Gonzalez i sur., 2000.) ili izdanci iz staklenika (Morrison i sur., 2000.; Debnath, 2004.), eksplantati sa sadnica (Lyrene, 1980.) i komadi rizoma (Barker i Collins, 1963.) također su korišteni za *in vitro* razmnožavanje borovnice.

Optimalni sastav medija i regulatora rasta razlikuju se ovisno o genotipovima borovnica (Tablica 2.). Dok je *Woody plant medium* (WPM) Lloyd i McCowna (1980) utvrđen kao najbolji za mikropropagaciju visokogrmolikog kultivara borovnice „Bluecrop“ (Wolfe i sur., 1983.), Debnath (2004.) uspješno je uspostavio *in vitro* kulturu niskog grma borovnice na modificiranom mediju namijenjenog prvenstveno za uzgoj brusnice (BM-C; Debnath i McRae, 2001b.). Zimmerman i Broome (1980.) izvijestili su da je 22,8 µM IAA + 73,8 µM 2iP optimalno za proliferaciju aksilarnih izdanaka. Iako su niskogrmolike borovnice proizvele više izdanaka povećanjem koncentracije 2iP s 0 na 147,6 µM (Frett i Smagula, 1983.), kontrastno tri klona visokogrmolike borovnice proizvela su manje izdanaka na 147,6 M nego kod nižih koncentracija (Chandler i Draper, 1986.). Neki istraživači rutinski koriste hladni tretman na 4 °C u tamnom prostoru s 2iP za inicijaciju novog rasta eksplantata (Orlikowska, 1986.). Međutim, 2iP pokazuje određenu fitotoksičnost pri visokim dozama, posebno u fazi uspostavljanja kulture, kada mnogi eksplantati posmeđe i odumru. Kombinacija zeatina i 2iP manje je fitotoksična za nove eksplantate nego sami 2iP, a i producira veću stopu inicijacije (Eccher i Noè, 1989.). Zeatin je učinkovitiji u inicijaciji izdanaka vrsta *Vaccinium* (Reed i Abdelnour-Esquivel, 1991.; Gonzalez i sur., 2000.; Debnath, 2004.) i za proliferaciju izdanaka niskogrmolike (Debnath, 2004.) i visokogrmolike borovnice (Chandler i Draper, 1986.; Eccher i Noè, 1989.), iako Gonzalez i

sur. (2000.) iznose pozitivne učinke na umnožavanje izdanaka borovnice visokog grma s 25 M 2iP. Mala koncentracija auksina je blagotvorna ako se dodaje mediju, za inicijaciju, npr. 5,7 μM IAA (Morrison i sur., 2000.). Međutim, Frett i Smagula (1983.) predložili su uporabu samog 2iP u svakom mediju prije ukorjenjivanja. Koristeći modificirani medij za brusnicu koji sadrži nisku koncentraciju zeatina (2 - 4 μM) i saharoze (20 gl/1), Debnath (2004.) je izvijestio o povećanom razmnožavanju izdanaka niskogrmolike borovnice za oko 50 do 100 puta u intervalu od 12 tjedana. Svjetlost igra ključnu ulogu u morfogenezi *in vitro* kulture borovnica. Izdanci izloženi nižoj razini svjetlosti (15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pokazali su bolju stabilnost i izdržljivost niskogrmolike borovnice (Debnath, 2004.). U usporedbi s kontrolnim tretmanom (55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), jaka svjetlost imala je negativne učinke na *in vitro* proliferaciju izdanaka visokogrmolike borovnice (Noè i Eccher, 1994.). Multiplikacija izdanaka može se poboljšati ponovljenom subkultivacijom (Debnath, 2004.).

Tablica 2. Primjeri hranidbenih podloga i regulatora rasta (PGR) koji se koriste u mikropropagaciji *in vitro* kod *Vaccinium* vrsta metodom proliferacije aksilarnih pupova.

VRSTA	Hranidbena podloga	Inicijacija izdanka	Multiplikacija izdanka	Ukorjenjivanje	Izvor
<i>V. angustifolium</i> A.	Z-2	73,8 μM 2iP+22, μM IAA	98.4 μM 2iP + 5.7 μM IAA	<i>ex vitro</i>	Frett and Smagula (1983.)
<i>V. angustifolium</i> A.	Z-2	49.2-73.8 μM 2iP+ 11.4-22.8 μM IAA	59.0 μM 2iP	<i>ex vitro</i> (4.9 mM IBA)	Brissette i sur. (1990.)
<i>V. angustifolium</i> A.	Z-2	73.8 μM 2iP+ 5.7 μM IAA	73.8 μM 2iP+ 5.7 μM IAA	<i>ex vitro</i>	Morrison i sur. (2000.)
<i>V. angustifolium</i> A.	modificirani BM-C	5.0 μM zeatin ili 10.0 μM 2iP	2.0-4.0 μM zeatin	<i>ex vitro</i> (4.9 mM IBA)	Debnath (2004.)
<i>V. ashei</i> R.	Modificirani Knop (1965.)	73.8 μM 2iP	73.8 μM 2iP	<i>ex vitro</i> (14.7 mM IBA)	Lyrene (1980.)
<i>V. corymbosum</i> L.	WPM soli i MS vitamini	18 μM zeatin	25 μM 2iP	<i>ex vitro</i>	Gonzalez i sur. (2000.)
<i>V. corymbosum</i> L.	PMN	36.9 μM 2iP	36.9 μM 2iP	<i>ex vitro</i> (4.9 mM IBA)	Noè and Eccher (1994.)

<i>V. macrocarpon A.</i>	Anderson's (1975.) makrosoli+MS mikrosoli i organski dodaci	150 μ M 2iP+1.0 μ M IBA	150 μ M 2iP+ 1.0 μ M IBA	<i>ex vitro</i>	Marcotrigiano i McGlew (1991.)
<i>V. macrocarpon A.</i>	Z-2 soli	98.4 μ M 2iP+ 5.7 μ M IAA	98.4 μ M 2iP+ 5.7 μ M IAA	<i>In vitro</i> (98.4 μ M 2iP +5.7 μ M IAA)	Smagula i Harker (1997.)
<i>V. macrocarpon A.</i>	Makrosoli i vitamini+MS mikrosoli (BM-C)	12.3-24.6 μ M 2iP	12.3-24.6 μ M 2iP	<i>In vitro</i> (bez PGR)	Debnath i McRae (2001a.)
<i>V. macrocarpon A.</i>	Modificirani BM-C	2.0-4.0 μ M zeatin	2.0-4.0 μ M zeatin	<i>In vitro</i> (2.0-4.0 μ M zeatin)	Debnath i McRae (2005.)
<i>V. myrtillus M.</i>	Modificirani MS	49.2 μ M 2iP	24.6 μ M 2iP	<i>In vitro</i> (0.49 μ M IBA), <i>ex vitro</i> (2.1 mM K-IBA)	Jaakola i sur. (2001.)
<i>V. vitis-idaea L.</i>	Modificirani MS	2.2-4.4 μ M BA ili 4.9 μ M 2iP	4.9 μ M 2iP	<i>In vitro</i> (2.2 μ M BA ili 1mM IAA)	Gebhardt i Friedrich (1986.)
<i>V. vitis-idaea L.</i>	WPM	73.8 μ M 2iP	73.8 μ M 2iP	<i>ex vitro</i>	Talbot i Holloway (2002.)
<i>V. vitis-idaea L.</i>	Modificirani BM-C	0.1-1.0 μ M TDZ	1.0 μ M zeatin	<i>ex vitro</i> (39.4 mM IBA)	Debnath (2005a.)
<i>V. vitis-idaea L.</i>	Modificirani MS	24.6 μ M 2iP	24.6 μ M 2iP	<i>ex vitro</i> (2.1 mM IBA)	Jaakola i sur. (2001.)
<i>Vaccinium spp.</i>	Modificirani WPM	18.2 μ M zeatin	24.6 μ M 2iP	Nema podataka	Reed i Abdelnour Esquivel (1991.)

** Hranidbene podloge: BMC = Debnath i McRae (2001b), MS = Murashige i Skoog (1962), WPM = Lloyd i McCown (1980), Z-2 = Zimmerman i Broome (1980), PMN = Eccher i sur., (1986). Regulatori rasta: BA = 6-benzilaminopurin, IAA = 3-indolil-3-octena kiselina, IBA = 3-indolil-3-maslačna kiselina, 2iP = 2-izopentenil adenin, TDZ = thidiazuron.

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

3.3.2. Regeneracija adventivnih izdanaka borovnice *in vitro*

Prvu tvorbu kalusa u *in vitro* kulturi niskogrmolike borovnice su opisali Nickerson i Hall (1976.) na MS mediju sa 0,45 ili 2,26 μM 2,4-diklorofenoksiocetene kiseline (2,4-D). Nickerson (1978a.) je također koristio eksplantate ploda uzgajane na Nitsch-ovom (1965.) mediju uz dodatak 0,45 μM , 2,4-D i 0,46 μM kinetina za dobivanje rasta kalusa. Dobivanje izdanaka iz kalusa nije bilo uspješno; stvaranje mnoštva izdanaka postignuto je korištenjem eksplantata sa sadnica i Anderson (1975.) medija koji sadrži IAA i 2iP (Nickerson, 1978b.; Tablica 3). Kalus je induciran na „rabbiteye“ borovnici (Lyrene, 1978.), a regeneraciju izdanka iz kalusa pomoću nodijalnih segmenata inicirali su Hruskoci i Read (1993.). Neke studije izvijestile su o uspjehu u razvoju mikropropagacije koja inicira pupoljke na eksplantatu lista borovnice (Billings i sur., 1988.; Dweikat i Lyrene, 1988.; Callow i sur., 1989.; Rowland i Ogden, 1992.; Cao i Hammerschlag, 2000.; Cao i sur., 2002.; Tablica 3.). Položaj lista na izdanku utječe na regeneraciju izdanaka, pri čemu mladi listovi koji se šire imaju veći morfogogenetski potencijal od starijih, potpuno proširenih listova. Jednostavan i pouzdan protokol za veliku frekvenciju regeneracije izdanaka iz eksplantata lista visokogrmolike borovnice kultivara „*Bluecrop*“ izvijestili su Cao i sur. (2002.) koji se oslanjaju na dvostupanjski predtretman i regeneraciju na TDZ mediju. Najviše 98% eksplantata regenerira izdanke sa 11 novih izdanaka po eksplantatu lista nakon 62 dana. Medij za predtretman # 1 sadrži 5 μM TDZ i 2,6 μM NAA 4 dana, medij za predtretman # 2 koji sadrži 7 μM zeatin riboze i 2,6 μM NAA tijekom 3 dana; regeneracijski medij sadrži 1 μM TDZ na 6 tjedana, i zadnji medij bez hormona rasta traje 10 dana.

Tablica 3. Primjeri hranidbenih podloga i regulatora rasta (PGR) u mikropropagaciji *in vitro* kod *Vaccinium* vrsta metodom regeneracije adventivnih izdanaka.

<i>Vrsta</i>	<i>Izvor eksplantata</i>	<i>Hranidbena podloga</i>	<i>Regeneracija izdanka</i>	<i>Elongacija izdanka</i>	<i>Izvor</i>
<i>V. angustifolium A.</i>	Hipokot./Kotiled.	Anderson (1975.)	73.8 μM 2iP+ 22.8 μM IAA + 0.43 mM AS	19.7 μM 2iP + 11.4 μM IAA	Nickerson (1978b.)
<i>V. corymbosum L.</i>	List	Pola MS	5.0-25.0 μM 2iP	25.0 μM 2iP	Callow i sur. (1989.)
<i>V. corymbosum L.</i>	List	Modificirani WPM	20.0 μM ZR	24.6 μM 2iP+ 9.1 μM zeatin	Rowland i Ogden (1992.)

<i>V. corymbosum L.</i>	Stabljika	Z-2	25.0 μ M zeatin	Nema podataka	Hruskoci i Read (1993.)
<i>V. corymbosum L.</i>	List	Modificirani WPM	20.0 μ M ZR, 1.0 μ M TDZ	Bez PGR	Cao i Hammerschlag (2000.)
<i>V. corymbosum L.</i>	List	Modificirani WPM	1.0 μ M TDZ ^x	Bez PGR	Cao i sur. (2002.)
<i>V. macrocarpon A.</i>	List	Modificirani Anderson (1975.)	10.0 μ M TDZ + 1.0 μ M NAA	Bez PGR	Marcotrigiano i sur. (1996.)
<i>V. macrocarpon A.</i>	Liste	Anderson (1975.) soli + MS organski dodaci	10.0 μ M TDZ + 5.0 μ M 2iP	Bez PGR	Qu i sur. (2000.)
<i>V. vitis-idaea L.</i>	List	Modificirani MS, modificirani BM-C	20.0-30.0 μ M zeatin	Bez PGR	Debnath i McRae (2002.)
<i>V. vitis-idaea L.</i>	Hipokotil	Modificirani MS	5.0-10.0 μ M TDZ	1.0-2.0 μ M zeatin	Debnath (2003b.)
<i>V. vitis-idaea L.</i>	List	Modificirani BM-C	1.0-5 μ M TDZ	1.0-2.0 μ M zeatin	Debnath (2005c.)

**Hranidbene podloge: BM-C = Debnath i McRae (2001b), MS = Murashige i Skoog (1962), WPM = Lloyd i McCown (1980), Z-2 = Zimmerman i Broome (1980). Regulatori rasta: AS =adenin sulfat, IAA =indolil-3-octena kiselina, 2iP =2-izopentenil adenin, NAA =1-naftalenoctena kiselina , TDZ = thidiazuron, ZR = zeatin-riboza. Z^x: eksplantati su kultivirani na predtretmanskome mediju koji sadrži 5 μ M TDZ i 2,6 μ M NAA tijekom četiri dana, a zatim su prebačeni na predtretmanski medij sastava 7 μ M ZR i 2,6 μ M NAA na tri dana prije uzgoja na regeneracijskome mediju.

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

3.3.3. Rizogeneza/ukorjenjivanje i aklimatizacija borovnice

Proizvodnja biljaka završava se disekcijom izdanaka *in vitro*, a potom ih se potiče da proizvede adventivno korijenje bilo *in vitro* ili, najčešće, u *ex vitro* uvjetima na kiselom supstratu poput: 1 treset : 1 perlit (v/v; Gonzalez i sur., 2000), 4 treset : 2 vermikulit : 1 perlit (v/v/v; Morison i sur., 2000.) bez predtretmana s auksinom. Predtretman s auksinom bio je nepotreban za *ex vitro* ukorjenjivanje borovnica (Gonzalez i sur., 2000.), iako je Debnath

(2004.) utvrdio 85 – 95% ukorijenjenih niskogrmolikih kultivara borovnice kad je mikro izdanke uranjao u 4,9 mM IBA prije sadnje u supstrat 2 treseta: 1 perlit (v/v). Za *ex vitro* ukorjenjivanje, mikro izdanci se obično održavaju u komori s vrlo visokom relativnom vlagom zraka (95%), a zatim se prebacuju u staklenik (85% RVZ) za aklimatizaciju. Rizogeneza mikro izdanaka borovnice *ex vitro* može smanjiti troškove (Zimmerman, 1987.), iako je proces često sporiji nego *in vitro* postupak (Wolfe i sur., 1983.). U *in vitro* postupku može se inducirati u mediju za proliferaciju izdanaka koji sadrži 1-2 μM zeatina (Debnath, 2006.).

3.3.4. Suvremena proizvodnja borovnice *in vitro* na tekućoj podlozi – TIS bioreaktori

Bioreaktor je sterilni, samostalni uređaj prikazan na Slici 17. koji radi na principu zračnoga sustava koji pumpa ili ispumpava tekući hranjivi medij na ili s biljnog materijala te omogućava kontrolu mikroklimatskih uvjeta te intenzivira odnosno ubrzava proces mikropropagacije (Paek i sur., 2005.).



Slika 17. TIS - SETIS® bioreaktor s borovnicom FAZOS (Foto: Milaković, 2019.)

Korištenjem bioreaktora u mikropropagaciji omogućeno je pratiti i kontrolirati brzinu strujanja zraka ili pojedinog plina, temperaturu, pH, razinu otopljenog kisika i brzinu

miješanja i strujanja što rezultira zdravijim, kvalitetnijim i većim brojem dobivenih biljaka te smanjenjem troškova (Heyerdahl i sur., 1995.).

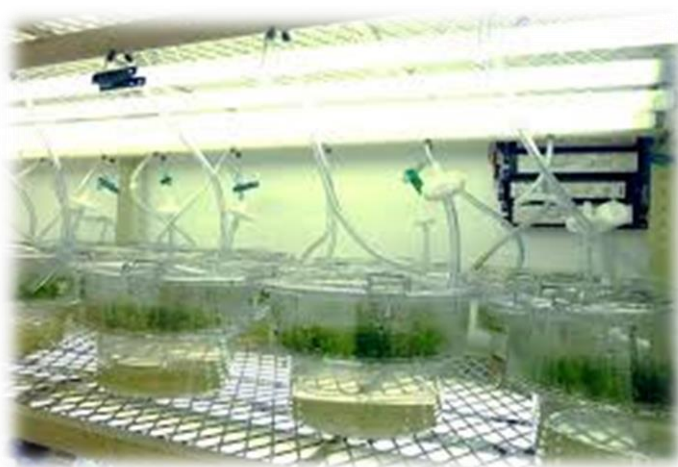
Bioreaktori koji se koriste za biljne vrste mogu se svrstati na one u kojima su biljke stalno uronjene u hranjivi medij, one u kojima su djelomično uronjene u hranjivi medij i one u kojima su povremeno uronjene u hranjivi medij tokom ciklusa (Debnath, 2010.).

Debnath S.C. (2010.) je iznio klasifikaciju bioreaktora koji se koriste u mikropropagaciji na četiri kategorije s obzirom na način pokretanja a to su :

1. Bioreaktori mehaničkog sustava
2. Bioreaktori pneumatskog sustava
3. Bioreaktori zatvorenog sustava
4. Bioreaktori sustava povremenog uranjanja odnosno imerzije (TIB/TIS sustav)

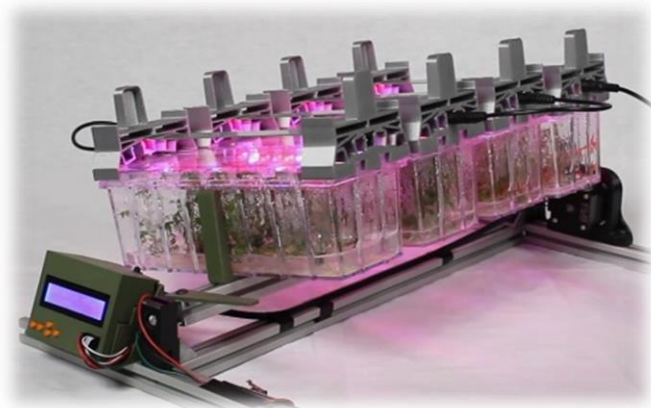
Harris i Mason (1983.) godine razvili su prvi TIB/TIS sustav (eng. „*Temporary Immersion System*“). Imerzni bioreaktori TIB (eng. „*Temporary Immersion Bioreactor*“) najnovija su generacija bioreaktora i njihov razvoj i usavršavanje u stalnom su rastu, a primjeri nekih sustava prikazani su na Slikama 17, 18. i 19.

Ovakav sustav osigurava visoku učinkovitost, kraći ciklus reprodukcije klonskog materijala, poboljšanu multiplikaciju, smanjenje broja dodatne radne snage, smanjenje troškova primjene medija, uštedu električne energije te masovnu proizvodnju (Debnath, 2010.).



Slika 18. MATIS bioreaktori (TIB)

Izvor: <http://www.bioreactor-matis.com/en/>



Slika 19. MICROROCKER bioreaktor (TIB)

Izvor: <https://www.youtube.com/watch?v=pH5VMgJR5ME>

Sustav se sastoji od posuda sa biljkama koje su odvojene od posuda sa hranjivim medijem a pomoću pneumatike i unaprijed zadanog ciklusa biljni materijal se povremeno potapa kako bi životne potrebe bile zadovoljene. Najvažnije komponente TIB sustava su računalna kontrolna upravljačka jedinica (CPU) prikazana na Slici 20. i pneumatska jedinica prikazana na Slici 21., odnosno kompresor, koji neprestano stvara čisti i nekontaminirani suhi zrak i ove dvije jedinice moraju biti u nesmetanoj vezi da bi mikroklimatski uvjeti u bioreaktoru zadovoljili potrebe biljaka (Stanisavljević i sur., 2017. i 2018.).



Slika 20. Kontrolna upravljačka jedinica
(Foto: Milaković, 2019.)



Slika 21. Pneumatska jedinica
(kompresor), (Foto: Milaković, 2019.)

4. ZAKLJUČAK

Suvremena voćarska proizvodnja u Hrvatskoj zadnjih dvadesetak godina u velikoj mjeri temeljena je na transferu tehnologije iz referentnih europskih voćarskih regija te komplementarnih oplemenjivačkih centara. Pored razvoja pomotehnoških mjera, uvođenja preciznih modela navodnjavanja i gnojidbe, uvođenja novog sortimenta, unapređenja postharvest tehnologije u cilju što veće standardizacije visoko tehnološkog pristupa modelu intenzivne proizvodnje višegodišnjih kultura, još uvijek se nameće problem nedostatka visoko kvalitetnog reprodukcijuskog sadnog materijala. Moderna rasadničarska praksa i praksa istraživačkih laboratorija razvijenih članica Europske unije u proizvodnji sadnica vrste *Vaccinium*, ali i ostalih strateških voćnih kultura, temelji se dijelom ili u potpunosti na uporabi suvremenih biotehnoških metoda (mikropropagacija, kultura tkiva *in vitro*).

Mikropropagacija osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog sadnog materijala u kratkom vremenskom intervalu jer se proizvodnja odvija u kontroliranim i aseptičnim uvjetima. Glavne prednosti navedene tehnologije su mala količina potrebnog inicijalnog biljnog materijala zbog čega se ne moraju formirati veliki matičnjaci, a koeficijent multiplikacije je visok. Također ne postoji ovisnost od godišnjih doba, a ušteda na prostoru i vremenu potrebnom za uzgoj je značajna.

Međutim, pokretanje ili ulaženje u novi proizvodni ciklus često je ključni i ograničavajući faktor uspješnosti *in vitro* kulture (osigurati aseptičnu kulturu, posebice ako se koristi biljni materijal uzgojeni van zaštićenih uvjeta - nasad). Glavni razlog tome je visoki stupanj endo i egzogenog onečišćenja, odnosno kontaminacije raznim biljnim patogenima i štetočinama. Također, eksplantati prilikom faze uvođenja i inicijacije proliferacije često posmeđe i odumiru (fonolna oksidacija / fenolono posmeđenje), dijelom zbog jakih uvjeta sterilizacije ili oksidacije reznih rana. Zadnjih godina dosta se radi na sprječavanju ovih negativnih pojava određenim predtretmanima, a rezultati su vrlo pozitivni. Kako je sama *in vitro* tehnologija relativno nova (uvođenje bioreaktora, TIS sustavi) i podložna brojnim modifikacijama, neprestano se radi na poboljšanju laboratorijskih protokola za komercijalni uzgoj. Zbog velike varijabilnosti genotipova unutar roda *Vaccinium*, neke vrste i kultivari zahtijevaju daljnja istraživanja u cilju optimizacije protokola.

Prema danom pregledu u ovom završnom radu primjećujemo da mnogi istraživači koriste široki spektar hranidbenih medija i PGR-a (regulatora rasta / hormona) u različitim koncentracijama za različite genotipove unutar vrsta *Vaccinium*. Najčešće korištene hranjive

podloge u mikropropagaciji borovnice su WPM, MS, Anderson i njihove modifikacije. Što se tiče hormona, istraživanja se vrše s raznim kombinacijama i koncentracijama zeatina, 2iP, TDZ, IAA i IBA na nodijalnim segmentima, aksilarnim pupovima i listu kao izvoru eksplantata. Trenutno nedostaju potrebna znanja u propagaciji *Vaccinium* vrsta putem somatske embriogeneze. Razmnožavanje biljaka kulturom tkiva *in vitro* može izazvati genetske i epigenetske promjene (somaklonalne varijacije). Genetsku stabilnost tijekom mikropropagacije kontroliraju brojni čimbenici kao što su: unutarnji biljni faktori (genotip, podrijetlo eksplantata, itd.) i vanjski faktori (protokol, vrste i sekvence medija, koncentracije hormona).

U cilju još veće učinkovitosti i masovnosti posljednjih godina veliku ekspanziju ima reprodukcija klonskog materijala u bioreaktorima nove generacije. TIB (eng. „*Temporary Immersion Bioreactor*“) sustavi, odnosno submerzni bioreaktori, koriste tekuću hranjivu podlogu bez dodavanja agara kao zgušnjivača čvrstog medija - gel. To su visoko modularni biotehnološki sustavi koje karakterizira visoka učinkovitost i skraćeni ciklus proizvodnje uslijed bržeg rasta biljnih kultura. Povećana je stopa multiplikacije, stopa preživljavanja u fazi aklimatizacije (*ex vitro*) te je utvrđena odlična adaptibilnost transplantiranih biljka na vanjske uvjete (*in vivo*). Dodatno prednosti su smanjenje troškova pripreme medija, ušteda električne energije, potrebne radne snage i laboratorijskog prostora. Zbog poboljšanih konstrukcijskih rješenja olakšana je manipulacija biljnim materijalom čime se lakše i jednostavnije postiže masovna proizvodnja. Visoka razina automatizacije te masovna proizvodnja velikim kompanijama omogućava superiorne uvjete na tržištu, a europskim proizvođačima voća osigurava repromaterijal deklarirane kvalitete po povoljnijim cijenama.

Podizanje razine tehnoloških procesa uvođenjem navedene tehnologije u rasadničarsku i istraživačku praksu naše zemlje nameće se kao imperativ koji je potrebno ostvariti. Stoga je nužno u narednom periodu osigurati transfer tehnologije renomiranim rasadničarima kako bi se zadovoljili zahtjevi domaćeg tržišta i osigurala opstojnost obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava koja se bave proizvodnjom voća na temelju konkurentne proizvodnje.

5. POPIS LITERATURE

1. Anderson, W.C. (1975.). Propagation of rhododendrons by tissue culture. Part I: Development of a culture medium for multiplication of shoots. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 25:129-135.
2. Ballington, J.R. (2001.). Collection, utilization, and preservation of genetic resources in *Vaccinium*. *HortScience* 36:213-220
3. Barker, W.G. and W.B. Collins (1963.). The blueberry rhizome: In vitro culture. *Can.J. Bot.* 41:1325-1329.
4. Billings, S.G., C.K. Chin and G.Jelenkovic (1988.). Regeneration of blueberry plantlets from leaf segments. *HortScience* 23:763-766.
5. Brissette, L., L.Tremblay and D.Lord (1990.). Micropropagation of lowbush blueberry from mature field-grown plants. *HortScience* 25:349-351.
6. Callow, P., K.Haghighi, M.Giroux and J.Hancockn (1989.). In vitro shoot regeneration on leaf tissue from micropropagated highbush blueberry. *HortScience* 24:373-375
7. Cao, X. and F.A. Hammerschlag (2000.). Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. *HortScience* 35:945-947.
8. Cao, X., F.A.Hammerschlag and L. Douglass (2002.). A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. Bluecrop. *HortScience* 37:819-821.
9. Chandler, C.K. and A.D. Draper (1986.). Effect of zeatin and 2iP on shoot proliferation of three highbush blueberry clones in vitro. *HortScience* 21:1065-1066.
10. Cohen, D. (1980.) Application of micropropagation methods for blueberries and tamarillos. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30:144-146.
11. Cohen, D. and D.Elliot (1979.). Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 29:177-179. *ence* 37:819-821.
12. Cristoni, A. and M.J. Magistretti. (1987.). Antiulcer and healing activities of *Vaccinium myrtilus* anthiocyanosides. *Farmaco [Pratica]* 42:29-43
13. Debnath S.C. (2003a.). Micropropagation of small fruits. In: S.M Jain and K.Ishii(eds.).*Micropropagationofwoodytreesandfruits*.KluwerAcademicPublishers, Dordrecht. 465-506.
14. Debnath, S.C. (2003b.). Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry(*Vacciniumvitis-idaea*L.).*InVitroCell.Dev.Biol.-Plant*39:490-495.

15. Debnath, S.C. (2004.). In vitro culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Small Fruits Rev.* 3:393-408.
16. Debnath, S.C. (2005a.). Micropropagation of lingonberry: Influence of genotype, explant orientation, and overcoming TDZ-induced inhibition of shoot elongation using zeatin. *HortScience* 40:185-188.
17. Debnath, S.C. (2005c.). A Two-step procedure for adventitious shoot regeneration from in vitro-derived lingonberry leaves: Shoot induction with TDZ and shoot elongation using zeatin. *HortScience* 40:189-192.
18. Debnath, S.C. (2006.). Influence of propagation method and indole-3-butyric acid on growth and development of in vitro and ex vitro-derived lingonberry plants. *Can. J. Plant Sci.* 86:235-243.
19. Debnath S.C. (2007): Propagation of *Vaccinium* in Vitro , *International Journal of Fruit Science*, 6:2, 47-71
20. Debnath, S. C. (2010.). A scaled-up system for in vitro multiplication of thidiazuron-induced red raspberry shoots using a bioreactor. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 85: 94-100.
21. Debnath, S.C. and K.B. McRae (2001a.). An efficient in vitro shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant* 37:243-249.
22. Debnath, S.C. and K.B. McRae (2001b.). In vitro culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.): The influence of cytokinins and media types on propagation. *Small Fruits Rev.* 1:3-19.
23. Debnath, S.C. and K.B. McRae (2002.). An efficient adventitious shoot regeneration system on excised leaves of micropropagated lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 77:744-752.
24. Debnath, S.C. and K.B. McRae (2005.). A one-step in vitro cloning procedure for cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.): The influence of cytokinins on shoot proliferation and rooting. *Small Fruits Rev.* 4:57-75.
25. Dubravec, K.D. i Dubravec, I. (1998.). *Kultivirane biljne vrste Hrvatske i susjednih područja*. Školska knjiga, Zagreb.
26. Dujmović Purgar Dubravka., Zoran Šindrak, Darko Mihelj, Sandra Voća, Boris Duralija *Rasprostranjenost roda Vaccinium u Hrvatskoj, Pomologia Croatica, izvorni znanstveni članak, Vol.13-2007.br.4, 220-224.*
27. Dweikat, M. and P.M. Lyrene (1988.). Adventitious shoot production from leaves of blueberry cultured in vitro. *HortScience* 23:629.

28. Eccher, T. and N. Noè (1989.). Comparison between 2iP and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*). *Acta Hort.* 441: 185-190.
29. Frett, J.J. and J.M. Smagula (1983.). In vitro shoot production of lowbush blueberry. *Can. J. Plant Sci.* 63:467-472.
30. Galletta, G.J. and J.R. Ballington. (1996). Blueberries, cranberries and lingonberries, pp.1-107. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). *Fruit breeding. Vol. II, Vine and small fruit crops.* Prentice Hall, New York.
31. Gebhardt, K. and M. Friedrich (1986.). In vitro shoot regeneration of lingonberry clones. *Gartenbauwissenschaft* 51:170-175.
32. Gelenčir, J. i Gelenčir N. (1991.). *Atlas ljekovitog bilja.* Prosvjeta, Zagreb.
33. Gelenčir, N. (1987.). *Prirodno liječenje biljem i ostalim sredstvima.* Nakladni zavod Znanje, Zagreb.
34. George, E.F., D.J.M. Puttock, and H.J. George (1987.). *Plant culture media*, vol. 1. Exergetics Ltd., Edington.
35. Gonzalez, M.V., M. Lopez, A.E. Valdes, and R.J. Ordas (2000.). Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Ann. Appl. Biol.* 137:73-78.
36. Grout, J.M. and P.E. Reed (1986.). Influence of stock plant propagation method on tissue culture and leaf-bud propagation of 'Northblue' blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:368-371.
37. Harris R, Masson E (1983.). Two machines for in vitro propagation of plants in liquid media. *Can J Plant Sci* 63:311–316
38. Heyerdahl, Mohan Jain S., Gupta K. P., J. Newton R. 1995, 1999: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 263-291
39. Hong, V. and R.E. Wrolstad (1990.). Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J. Agr. Food Chem.* 38:708-515
40. Hruskoci, J.B. and P.E. Read (1993.). In vitro shoot regeneration from internode segments and internode-derived callus of blueberry (*Vaccinium* spp.). *Acta Hort.* 346:127-132.
41. Jaakola, L., A. Tolvanen, K. Laine, and A. Hohtola (2001.). Effect of N⁶-isopentenyladenine concentration on growth initiation in vitro and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 66:73-77.
42. Jelaska S. (1994.). *Kultura biljnih stanica i tkiva*, Školska knjiga, Zagreb.

43. Koide, T.; H. Kamei; Y. Hashimoto; T. Kojima i MHasegawa (1996.). Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. *Cancer Biother. Radiopharm.* 11:273-277
44. Leech, J. (2018.). 10 Proven Health Benefits of Blueberries. *Healthline.* 9.10.2018. <https://www.healthline.com/nutrition/10-proven-benefits-of-blueberries#section6>. 15.4.2019.
45. Litwińczuk, W. and J. Szczerba (1998.). The growth and development of highbush blueberry cultures (*Vaccinium corymbosum* L. Cv. Bluecrop) under different light sources. *Acta Physiol. Plant. (suppl.)* 20:24.
46. Lloyd, G. and B. McCown (1980.). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
47. Lyrene, P.M. (1978.). Blueberry callus and shoot-tip culture. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 91:171-172.
48. Lyrene, P.M. (1980.). Micropropagation of rabbiteye blueberries. *HortScience* 15:80-81
49. Lyrene, P.M. (1990.). Low-chill highbush blueberries. *Fruit Var. J.* 44:82-86
50. Marcotrigiano, M. and S.P. McGlew (1991.). A two-stage micropropagation system for cranberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116:911-916
51. Marcotrigiano, M., S.P. McGlew, G. Hackett, and B. Chawla. (1996.). Shoot regeneration from tissue-cultured leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44:195-199.
52. Međedović, S. i Ferhatović D. (2003.). Klonska proizvodnja sadnica drveća i grmlja. 17–18.
53. Milorad Šubić (2013.). Uzgoj američkih borovnica. 13.3.2013. <https://www.agroklub.com/vocarstvo/uzgoj-americkih-borovnica/9006> 13.5.2019.
54. Miljković, I. (2006.). Borovnica - uzgoj (*Vaccinium corymbosum* L.). *Gospodarski list* 18. 15.8.2006. <https://gospodarski.hr/uncategorized/uzgoj-borovnice/6941/>. 30.5.2019.
55. Mindel, E. (1998.). *Hrana kao lijek. Mozaik knjiga, Zagreb.*
56. Morrison, S., J.M. Smagula, and W. Litten. (2000.). Morphology, growth, and rhizome development of *Vaccinium angustifolium* Ait. seedlings, rooted softwood cuttings, and micropropagated plantlets. *HortScience* 35:738-741
57. Nickerson, N.L. (1978a.). Callus formation in lowbush blueberry fruit explants in vitro. *Hort. Res.* 18:85-91.

58. Nickerson, N.L. (1978b.). In vitro shoot formation in lowbush blueberry seedling explants. HortScience 13:698.
59. Nickerson, N.L. and I.V. Hall. (1976.). Callus formation in stem internode sections of lowbush blueberries cultured on a medium containing plant growth regulators. Hort. Res. 16:29-35.
60. Nitsch, J.P. (1965.). Culture in vitro de tissus de fruits. III. Mesocarpe et endocarpe de Peche. Bull. Soc. Fr. 112:22-25.
61. Noè N. and T. Eccher (1994.). Influence of irradiance on in vitro growth and proliferation of *Vaccinium corymbosum* (highbush blueberry) and subsequent rooting in vivo. Physiol. Plant. 91:273-275.
62. Orlikowska, T. (1986.). Micropropagation of highbush blueberry. FruitSci.Rep.13:105115.
63. Paek, K. Y., Chakrabarty, D. and Hahn, E. J. (2005.). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 81: 287-300
64. Pierik R.L.M. (1990.). Rejuvenation and Micropropagation. In: Nijkamp H.J.J., Van Der Plas L.H.W., Van Aartrijk J. (eds) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, vol 9. Springer, Dordrecht. 91-101.
65. Pliszka K. (1997.). Overview on *Vaccinium* production in Europe, Acta Horticulturae 446, 49-52.
66. Qu, L., J. Polashock and N. Vorsa (2000.). A high efficient in vitro cranberry regeneration system using leaf explants. HortScience 35:948-952.
67. Reed, B.M. and A. Abdelnour-Esquivel (1991.). The use of zeatin to initiate in vitro cultures of *Vaccinium* species and cultivars. HortScience 26:1320-1322.
68. Rowland, L.J. and F.A.Hammerschlag (2005.). *Vaccinium* spp. blueberry, In:R.E.Litz(ed.). Biotechnology of fruit and nut crops.CABIPubl.,Wallingford. pp.222-246.
69. Rowland, L.J. and E.I. Ogden (1992.). Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of highbush blueberry. HortScience 27:1127-1129
70. Sapers, G. and D. Hargrave (1987.). Proportions of individual anthocyanins in fruits of cranberry cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:100-104
71. Smagula, J.M. and J. Harker (1997.). Cranberry micropropagation using a lowbush blueberry medium. Acta Hort. 44:343-347.

72. Smagula, J.M. and P.M. Lyrene (1984.). Blueberry. In: P.V. Ammirato, D.A.Evans,W.R.SharpandY.Yamada(eds.).Handbookofplantcellculture,vol. 3. Macmillan, New York. 383-401
73. Stanisavljević, A., Bošnjak, D., Štolfa, I., Špoljarević, M., Popović, B., Lisjak, M., Teklić, T. (2017). Suvremena klonska reprodukcija biljaka, Zbornik sažetaka 52. hrvatski i 12. međunarodni simpozij agronoma, Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2017. 265-266.
74. Stanisavljević, A., Štolfa Čamagajevac, I., Popović, B., Bošnjak, D., Kujundžić, T., Viljanac, B., Teklić, T. (2018). Aklimatizacija biljaka malina iz TIB sustava inokuliranih s Bradyrhizobium sp. i rizobakterijama promotorima biljnog rasta (PGPR). 53. hrvatski i 13. međunarodni simpozij agronoma - Zbornik radova, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 2018. str. 530-534.
75. Stark, R., Hall I.V. i Hendrickson P.A. (1978.) The partridgeberry of Newfoundland. Canadex (Hort. Crops) 230
76. Talbot, V.L. and P.S. Holloway (2002.). On-farm tissue culture production of lingonberries. Acta Hort. 574:405-408.
77. Vander Kloet, S.P. (1988.). The Genus Vaccinium in North America. Res.BranchAgric. Can. Publ. 1828
78. Wang, H., M.G. Nair, M. Strasburg, Y.C. Chang, A.M. Booren, J.I. Gray, and D.L. DeWitt. (1999.). Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. J. Nat. Prod. 62:294-296.
79. Ware M. (2017.). Everything you need to know about blueberries. *Medical News Today*. 5.9.2017.<https://www.medicalnewstoday.com/articles/287710.php>, 30.5.2019.
80. Wolfe, D.E., P. Eck, and C. Chin. (1983.). Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. HortScience 18:703-705.
81. Zimmerman, R.H. (1991.). Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops, pp.. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic, Amsterdam. 231-246.
82. Zimmerman, R.H. and O.C. Broome (1980.). Blueberry micropropagation,. In: Proc. Conf. on Nursery Prod. of Fruit Plants Through Tiss. Cult.- Applications and Feasibility. USDA-SEA, Agr. Res. Results ARR-NE-11. pp. 44-47
83. Zimmerman,R.H. (1987.). Micropropagation of woody plants: Post tissue culture aspects. Acta Hort 227:489-499.