

# Mikropropagacija paulovnije (Paulownia spp.) u tekćem imerznom sustavu

---

**Marić, Marin**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:151:907987>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-02**



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

Marin Marić

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Biljna proizvodnja

**MIKROPROPAGACIJA PAULOVNIJE (*Paulownia spp.*) U TEKUĆEM  
IMERZNOM SUSTAVU**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marin Marić

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Biljna proizvodnja

**MIKROPROPAGACIJA PAULOVNIJE (*Paulownia spp.*) U TEKUĆEM  
IMERZNOM SUSTAVU**

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. doc.dr.sc. Monika Marković, predsjednik
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Miro Stošić, član

**Osijek, 2020.**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	3
2.1. Paulovnja ( <i>Paulownia spp.</i> ) porijeklo, rasprostranjenost i uporaba.....	3
2.2. Morfologija paulovnije.....	7
2.3. Zakonodavstvo vezano za uzgoj paulovnije kao strane vrste drveća u RH.....	9
2.4. Rasadnička proizvodnja paulovnije.....	11
2.5. Razmnožavanje paulovnije kulturom tkiva <i>in vitro</i> (mikropropagacija).....	12
2.6. Dosadašnja istraživanja na paulovnji u <i>in vitro</i> kulturi tkiva.....	14
2.7. Upotreba suvremenog TIB sustava u kulturi tkiva paulovnije.....	18
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	19
3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija.....	19
3.2. Biljni materijal u istraživanju.....	20
3.3. Tretmani u istraživanju.....	21
3.4. Mjerenja u istraživanju.....	23
3.5. Obrada podataka.....	24
<b>4. REZULTATI</b> .....	25
<b>5. RASPRAVA</b> .....	28
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	35
<b>7. POPIS LITERATURE</b> .....	37
<b>8. SAŽETAK</b> .....	43
<b>9. SUMMARY</b> .....	44
<b>10. POPIS TABLICA</b> .....	45
<b>11. POPIS SLIKA</b> .....	46
<b>12. POPIS GRAFIKONA</b> .....	48

## 1. UVOD

Paulovnja (*Paulownia spp.*) se uzgaja u Aziji već stoljećima, a najveće iskustvo u uzgoju pripada Kini s čak 2,5 milijuna hektara što ih ujedno čini i vrlo velikim izvoznicima drvne mase paulovnije. Također i u Europi se uzgaja više desetljeća i daje izvanredne rezultate. Osim izravne financijske koristi uzgajivaču doprinosi i lokalnoj i široj zajednici, tako što stavlja u funkciju neobrađeno poljoprivredno zemljište, održavanje bioraznolikosti u krajevima s pretežno ratarskim kulturama, podiže kvalitetu tla uslijed otpalog lišća, sprječava eroziju tla i popravljiva kvalitetu zraka. Paulovnja je izrazito medonosna biljka i predstavlja vrlo dobru pčelinju pašu. Posljednjih godina sve više svjedočimo širenju plantažnog uzgoja paulovnije u Republici Hrvatskoj. Prošle 2019. godine Ministarstvo poljoprivrede donosi Zakonu o drvenastim kulturama kratkih ophodnji (kulture za proizvodnju biomase) koji uređuje tržište, njihov uzgoj, a spominjalo se i uvrštavanje paulovnije na listu kultura koje podliježu politici poticaja. Upravo je iz navedenih razloga iskazan i povećan interes novih proizvođača za certificiranim sadnim materijalom provjerene kvalitete.

Prilikom razmnožavanja paulovnije sjemenom uslijed rekombinacije svojstava, nove biljke nisu identične majčinskoj biljci. Ujedno takve biljke kasnije cvatu, donosne plodove sa fertilnim sjemenom, a plantaže s takvim sadnicama rezultiraju lošom produkcijom drvne mase.

Glavni način razmnožavanja paulovnije u rasadnicima je nespolni (vegetativni), odnosno aseksualni. Stoga upotreba suvremene metode mikropropagacije u kulturi tkiva *in vitro* predstavlja vrlo veliki izazov u cilju dobivanja uniformnog, ujednačenog, zdravstveno ispravnog i certificiranog sadnog materijala. Ovom tehnikom od malog vegetativnog dijela (eksplantat) majčinske biljke donora u vrlo kratkom vremenskom periodu dobivamo vrlo veliki broj biljaka. Ovom metodom omogućava se multiplikacija ishodišnog materijala bez opasnosti od zaraze. Kod *in vitro* modela, uvjeti za rast i razvoj presadnica su strogo ograničeni, odnosno moguće je na vrlo malom prostoru proizvesti velik broj sadnica od samo jedne matične biljke.

Konvencionalni *in vitro* model mikropropagacije limitiran je upotrebom čvrstih ili polučvrstih medija, odnosno agara koji poskupljuje proizvodnju u odnosu na suvremeni imerzni sustav (TIB/TIS sustav). Ovaj sustav koristi tekući hranjivi medij kojeg je moguće

mijenjati i modificirati u svakom trenutku, potpuno je automatiziran te vrlo brz i efikasan. Učinkovitost mikropropagacije na tekućem i polukrutom mediju uvelike ovisi i o genotipu, tipu eksplantata, sezonskoj dinamici uzorkovanja, različitim koncentracijama regulatora rasta i hranjiva te staničnoj osjetljivosti.

Cilj ovog diplomskog rada usmjeren na ispitivanje mogućnosti optimizacije protokola razmnožavanja paulovnije (*Paulownia spp.*) mikropropagacijom usporedbom konvencionalnog modela proizvodnje *in vitro* na polučvrstom hranjivom mediju s imerznim bioreaktorima nove generacije (TIB/TIS sustav) koji koriste tekući hranjivi medij.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Paulovnja (*Paulownia spp.*) porijeklo, rasprostranjenost i uporaba

Paulovnja (Slika 1.) pripada porodici drvenastih biljka iz porodice *Paulowniaceae*, red *Lamiales*. Ime je dobila po nizozemskoj kraljici Anna Paulowna (1795 – 1865) koja je bila kćer ruskog cara Pavla I pa stablo paulovnije s toga nazivaju i „*princess tree*“.



**Slika 1.** Paulovnja (Izvor: <https://www.researchgate.net>)

Interes za paulovnijom u zapadnim zemljama datira još od 1970. Tvrtke koje se bave preradom drvne mase počela su uzgajati paulovnju kako bi zadovoljili lokalnu potražnju te izvoz na strana tržišta. U 1980-ima i 1990-im, uzgajivači u Sjedinjenim Američkim Državama i Australiji sade na tisuće hektara paulovnije kako bi zadovoljila potražnju, a prva sječa obavljena je u tek u kasnim 1990-ima (El-Showk i El-Showk, 2003.).

Važne vrste u ovom rodu su: *P. albiflora*, *P. australis*, *P. catalpifolia*, *P. elongata*, *P. fargesii*, *P. fortunei*, *P. kawakamii* i *P. tomentosa*. Vrste roda *Paulownia* rastu od prirode te kao kultivirane vrste u nekim dijelovima svijeta, uključujući Kinu, Japan i jugoistočnu Aziju, Europu, sjevernu i srednju Ameriku i Australiju, a vrste iz navedenog roda vrlo su prilagodljive na različite edafske i klimatske čimbenike i dobro rastu na marginalnim zemljištima (Drvodelić i sur. 2016).

Paulovnije pripadaju u pionirske vrste drveća (Drvodelić 2018a) sa svim osobinama koje posjeduju toj vrsti (rano rađanje sjemenom, sitno i mobilno sjeme, obilni urodi svake ili svake druge godine, brza ontogeneza, stabla kratkoga životnog vijeka, itd.). U Republici Hrvatskoj, na osnovu detaljnih terenskih opservacija, nije zabilježena invazivnost vrste *Paulownia tomentosa* (Slika 2.) iako je doduše primijećeno njezino širenje, ali na svega nekoliko lokaliteta i to u manjim grupama po nekoliko jedinki koje ne predstavljaju za sada opasnost za prirodnu vegetaciju i ekosustav (Drvodelić 2018b).



**Slika 2.** Paulovnja tomentosa (Izvor: <https://www.seeds-gallery.shop>)

Korištenje stabla paulovnije datira u davnu prošlost. Naime, u Japanu stabla se paulovnije koriste od 200-te godine poslije Krista i predstavljaju nacionalnu tradiciju. Rod *Paulownia* pripada među najbrže rastuće vrste drveća koje potječu iz Azije. U Japanu je poznata pod imenom „kiri“ ili „princess tree“. Uzgaja se u cijeloj Aziji već više stoljeća, a najviše iskustava imaju u Kini. Paulovnije se uzgajaju na površini od čak 2,5 milijuna hektara, pa je tako njihovo drvo jedan od jačih izvoznih proizvoda Kine. Većina proizvodnje paulovnije odvija se u Kini, sjeverno od Bejinga u blizini granice s Burmesom te na Tajvanu. *Paulownia catalpifolia*, *P. tomentosa* i *P. elongata* uzgajaju se na sjeveru od



rijeke Yangtse dok se *P. fortunei*, *P. kawakamii*, *P. fargesii*, *P. albiphloea*, *P. australis* i *P. taiwaniana* mogu pronaći na sjeveru Kine. *P. tomentosa*, također se može pronaći u Japanu i Koreji, ali je upitno da li je spontano uzgojena. *P. elongata*, *P. fortunei*, *P. kawakamii*, *P. taiwaniana* i *P. tomentosa* mogu se pronaći i u Sjevernoj Africi (Donald i sur., 1988).

Paulovnja kao energetska usjeva za proizvodnju biomase značajna je zbog svoje glavne prednosti - brzog rasta, ali i zbog mogućnosti regeneracije iz korijena. Vrste ovog roda pogodne su za osvajanje napuštenih poljoprivrednih površina ili za pospješivanje kakvoće tla (García-Morote i sur. 2014), a posebice u uvjetima kada se naglasak stavlja na brzu proizvodnju biomase (Joshee 2012). U energetske namjene koristi se za izradu peleta i bioetanolu (iznimno visoka energetska vrijednost). Paulovnja kao stočna hrana koristi se zbog visokog udjela bjelančevina (20%) i različitih mikroelemenata, što je čini iznimno kvalitetnim i probavljivim krmivom.

Prema Drvodeliću (2018b) drvo paulovnije je 50 % lakše od naših domaćih vrsta tvrdih listača (hrast, grab, itd.); izrazito je čvrsto (žilavo), ali i lako obradivo. Otporno je na habanje, djelovanje kiselina i lužina. Drvo je svijetle boje s finom strukturom i svilenkasto glatke površine, bez kvrga te vodootporno, a u daskama se lako i brzo suši te se pri tome ne iskrivljuje (Slika 3.). Kalorijska joj je vrijednost po jedinici suhe mase vrlo visoka, oko 4500 kcal, dok je bukvi ili grabu oko 2700 kcal. Energetski se izjednačuje s najkvalitetnijim ugljenom.



**Slika 3.** Drvena sirovina paulovnije (Izvor: <https://sc02.alicdn.com>)

Paulovnja je izrazito medonosna. Njezin med je cijenjen, a neki mu pripisuju čak i iscjeliteljska svojstva. Ima izrazito veliku sposobnost adsorpcije ugljičnog dioksida (CO<sub>2</sub>),

čak 10 puta više od drugih vrsta stabala, te isto tako i otpušta 10 puta više kisika (O<sub>2</sub>). Navedeno svojstvo daje mogućnost dodatnog prihoda prodajom CO<sub>2</sub> certifikata, koje tvrtke “zagađivači” zbog ispuštanje CO<sub>2</sub> u okoliš moraju kupovati. U Europi (Španjolska, Italija, Njemačka, itd.) se uzgaja već više desetljeća i daje izvanredne rezultate u prinosu drvene mase te u financijskoj isplativosti

Zbog navedenih svojstava vrlo je traženo drvo za izradu luksuznog namještaja, furnira, ploča, igračaka, biljarskih štapova, lijesova, a koristi se i kao sirovina za papir i biološka goriva. Drvo paulovnije upotrebljava se za izradu najkvalitetnijih klompi na svijetu. Visok odnos čvrstoće (jačine) i težine čini drvo paulovnije cijenjenim u brodogradnji, avio-industriji, izradi dasaka za surfanje i prikolica. Njegove izuzetne akustične osobine čine ga vrlo traženim za izradu glazbenih instrumenata (Slika 4.). Paulovnija je pogodna i za sanacije klizišta jer u kratkom roku korijen prodire na dubine od 5 do 10 m.



**Slika 4.** Izrada glazbenog instrumenta od paulovnije

(Izvor: <https://www.eyguitarmusic.com>)

Za proizvodnju stočne hrane sadi se u sklopu 4.000 biljaka po hektaru koje se kose kada porastu 80-90 centimetara i daju 6 do 7 otkosa na godinu. Paulovnija je i medonosno drvo, a cvjetovi se koriste i u farmaceutskoj industriji. Med od paulovnije je kvalitetan, svijetli, jasan, vrlo svijetao i aromatičan, po boji se može usporediti s bagremovim medom. Ljekovit je i može pomoći u liječenju bronhitisa i drugih respiratornih bolesti, a također poboljšati rad žuči i jetre i probave općenito. Listovi promjera oko 70 centimetara sadrže do 15% dušika, pa se rabe i u proizvodnji kvalitetnog humusa.

Izvorne Kineske vrste iz roda *Paulownia* (osim *Paulownia tomentosa*) kao i hibridi ne predstavljaju ekološki rizik za prirodni okoliš što potvrđuje Državni zavod za zaštitu prirode. Poznatije vrste i hibridi koji se sade u Republici Hrvatskoj su *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* te hibridi „*Shan Tong*“ i alohtoni hibrid *Paulownia tomentosa* x *Paulownia fortunei*, trgovačkog naziva *paulovnja 9501*. Pri uzgoju paulovnije važan je odabir kvalitetnih sadnica. Sadnice uzgojene iz korijenskih reznica ili *in vitro* metodom imaju visok postotak preživljena i veliku brzinu rasta. Istraživanja su pokazala brži rast paulovnije na čijem korijenu je inokulirana ektomikoriza.

## 2.2. Morfologija paulovnije

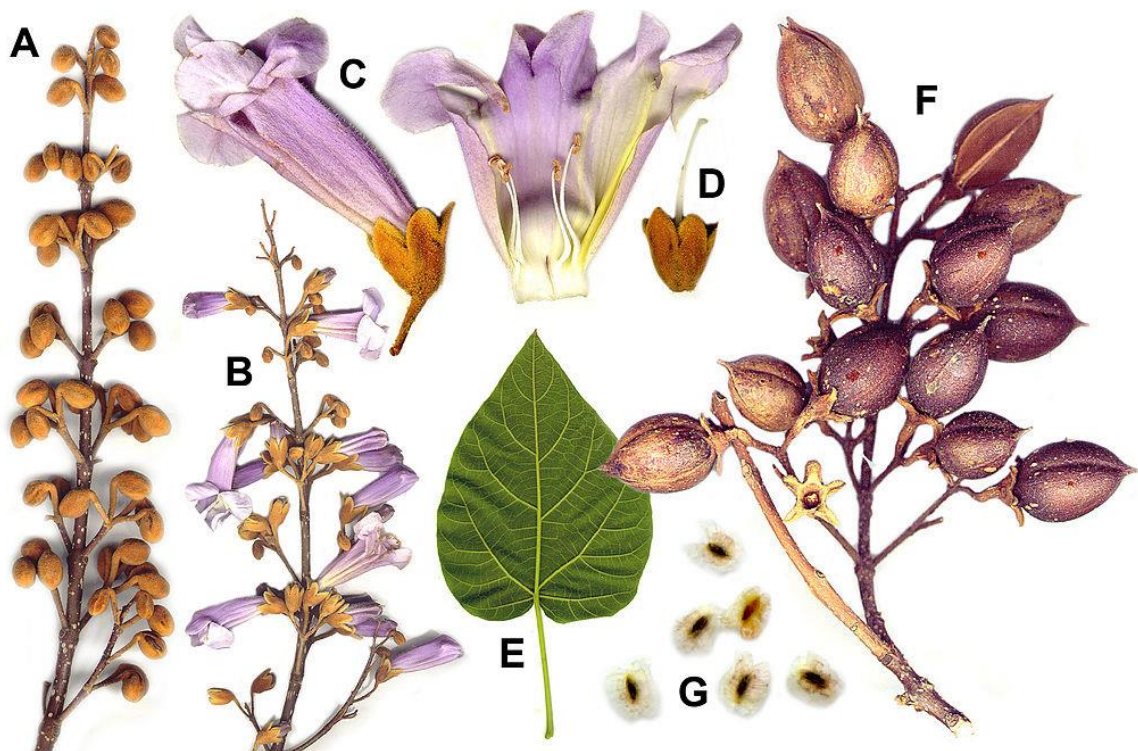
S obzirom na atraktivan izgled, paulovnja je dekorativno drvo koje krase široka krošnja koja u razdoblju od osam do deset godina izraste do 20 metara u visinu (Slika 5.). Godišnje naraste između 5 i 9 metara, a promjer stabla u istom razdoblju iznosi između 30 do 40 centimetara.



**Slika 5.** Plantaža paulovnije (Izvor: <https://www.pinterest.com>)

Veliki listovi koji krase ovu biljku su zelene boje, a s donje strane imaju sitne dlačice (Slika 6., E) široki su 10-20 cm s dužinom od 15-30 cm, a peteljka može biti duga 10-20 cm. Drvo paulovnije je mekano te ima široku primjenu u proizvodnji namještaja. Mahuna paulovnije ovalnog je oblika, drvenasta i veličine između 2,5 cm i 5 cm. Cvati su

terminalne i uspravne 15 – 30 cm s cvjetovima veličine 5 cm (C). Vrsta *Paulownia tomentosa* ima vrlo sitno sjeme koje se nalazi u jajastim plodovima, šiljastog vrha, smeđe boje, drvenasti, 3,5-4 cm dugački, 2-dijelni, višesjemeni tobolci, koji su posuti lenticelama i gusto žljezdasto dlakavi; na osnovi ovijeni drvenastom čaškom (F). Plodovi dozrijevaju u rujnu i listopadu i dugo ostaju na izbojcima. Otvaraju se tijekom zime i oslobađaju sjemenke, koje su vrlo uske, duguljaste, smeđe, uokolo okružene bijelim, nepravilnim, membranastim krilcem; zajedno s krilcem su 3-4 mm dugačke (G), 2-2,5 mm široke, anemohorne (šire se vjetrom). Masa 1000 zračno suhih sjemenki iznosi od 0,17-0,25 g. Sjeme vrste *Paulownia elongata* ima težinu od svega  $2,17 \times 10^{-4}$  g, odnosno broj čistih sjemenki u 1 kg kreće se u rasponu od 3 700 000 – 4 600 000 komada. Ovako sitno sjeme vjetar raznosi na udaljenosti veće od 1 km od roditeljskog stabla. Ostale vrste roda *Paulownia* imaju slične plodove i sjeme kao pustenasta paulovnja (*P. tomentosa*) (Drvodelić, 2018a).



**Slika 6.** Morfološke karakteristike paulovnije (Izvor: <https://upload.wikimedia.org>)

Površinsko korijenje je tanko, dihotomno se grana i vrlo je gusto. Apsorpcijsko korijenje ima veliku duljinu, debljine je od 1-5 mm i može narasti više od 60 cm. Na razvoj i distribuciju korijenskog sustava značajno utječe razina podzemnih voda, fizikalne značajke

tla i dostupnost hranjivima. Paulovnja je najpogodnija za sadnju na pjeskovitim tlima s dobrom drenažom. Gotovo 70-85% adsorpcijskog korijenja vrste *P. elongata* se rasprostire u radijusu od 40-100 cm. Dobro je poznato kako s plantažama paulovnije treba gospodariti intenzivno s dobrom opskrbom vode i hranjivih tvari (Barton i sur. 2007). Primjena vode i gnojidbe rezultira znatno boljim rastom šumskih plantaža (Madeira i sur. 2002; Campoe i sur. 2013), ali utjecaj vode i gnojiva ovisi primarno o plodnosti tla i dostupnosti vode (Nagy, 2003). Najbolje ju je saditi na plodnim, dubokim, pjeskovito-ilovastim ili ilovastim tlima s dobrom drenažom. Bergmann (1998) piše kako paulovnja ne zahtjeva sadnju nakon sječe jer se obnavlja izbojcima iz panja.



**Slika 7.** Korijen trogodišnje paulovnije (Izvor: Drvodelić 2018b.)

### **2.3. Zakonodavstvo vezano za uzgoj paulovnije kao strane vrste drveća u RH**

Kad je u pitanju paulovnja, niti jedan zakon i pravilnik ne propisuju koje vrste i hibridi se mogu, a koji ne smiju saditi na području Republike Hrvatske (Drvodelić, 2018a.). Registrirani rasadnici koji se bave uzgojem paulovnije imaju dozvolu uzgoja stranih vrsta *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud x *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl., komercijalnog naziva hibrid 9501 ili *Paulownia 'Shan Tong'* u svrhu njihova stavljanja na tržište Republike Hrvatske (Slika 8.). Dozvolu izdaje Ministarstvo zaštite okoliša i energetike uz prethodno pozitivno mišljenje Državnog zavoda za zaštitu prirode (Drvodelić, 2018a.).

U rješenju navedenog ministarstva piše:

*„Zavod je u svom mišljenju, na temelju dostupnih literaturnih podataka, utvrdio da za predmetni hibrid stranih vrsta Paulownia tomentosa (Thunb.) Steud. x Paulownia fortunei (Seem.) Hemsl., komercijalnog naziva hibrid 9501 ili Paulownia 'Shan Tong', prema literaturnim podacima nisu zabilježeni slučajevi nekontroliranog širenja ili prijenosa bolesti i štetnika unatoč dugogodišnjem korištenju predmetnog hibrida i čestom unosu u područja izvan prirodnog areala. Iako predmetni hibrid ima široku ekološku valenciju te u Republici Hrvatskoj postoje povoljna staništa za njegov rast, do sada nije utvrđeno nekontrolirano prirodno širenje na nova staništa, odnosno prirodno razmnožavanje unesenih jedinki u Republici Hrvatskoj niti u drugim, klimatski i stanišno sličnim područjima uvođenja.. Uz navedeno, provjerom u bazama podataka te u dostupnoj literaturi o biologiji predmetnih hibrida, kao i zabilježenim slučajevima i procjenama invazivnosti, Državni zavod za zaštitu prirode izdaje stručno mišljenje sukladno kojemu uzgoj i stavljanje na tržište Republike Hrvatske predmetnih hibrida ne predstavlja ekološki rizik“*



**Slika 8.** Hibridi paulovnije 9501 i Shan Tong  
(Izvor: <https://picclick.co.uk>; <https://indeks.hr>)

## 2.4. Rasadnička proizvodnja paulovnije

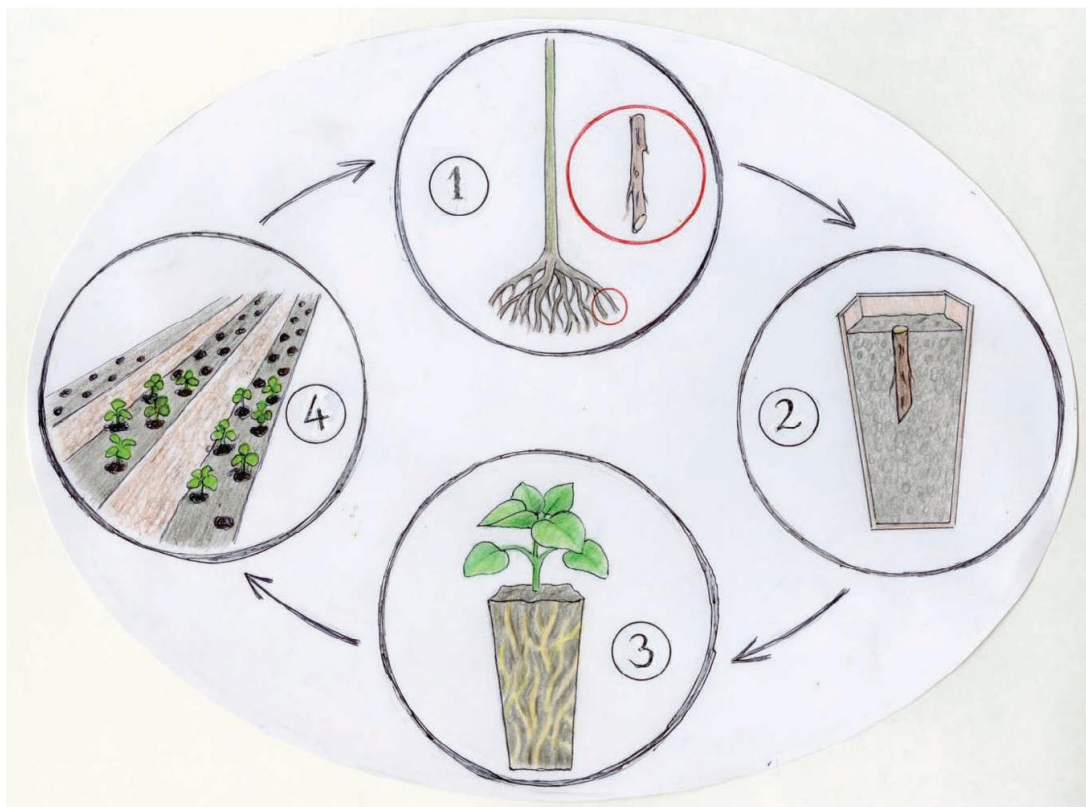
Vrste roda *Paulownia* u rasadniku se mogu razmnožavati generativnim načinom ili sjemenom, ali se to ne radi zbog osjetljivosti ponika i sporog rasta biljke u mladosti. Za klijanje ponika potrebna je stalna zračna vlažnost supstrata i visoka zračna vlaga te fluorescentno svjetlo 24 h (pozitivno fotoblastično sjeme), ako se radi u doba godine kad su kratki dani. Na 1 m<sup>2</sup> sije se 11-12 g sjemena vrste *Paulownia elongata* odnosno 46 000 do 50 000 sjemenki. Sjeme vrste *Paulownia elongata* počelo je s nicanjem u stakleniku rasadnika šestoga dana od sjetve, a sve sjeme je proklijalo za 12 dana. Laboratorijska klijavost iznosila je 57,25 %, a rasadnička 55,25 % (Dujmović, 2014).

Biljke uzgojene sjetvom sjemena kasnije cvatu i donose plodove sa sjemenom, a plantaže osnovane s takvim sadnicama daju loše rezultate u vidu neujednačene produkcije drvene mase. Kad neki hibrid razmnožavamo sjemenom, u potomstvu nikada nećemo dobiti sadnice istoga genotipa jer kod nekontroliranog oprašivanja ne znamo od kuda je došao polen s muških cvjetova (Drvodelić, 2018a.).

Glavni način razmnožavanja vrsta i hibrida paulovnije u rasadniku je nespolni, vegetativni odnosno aseksualni, a možemo ju razmnožavati autovegetativnim tehnikama makropropagacije (zagrtanjem, margotiranjem, korijenskim reznicama, zelenim vršnim reznicama stabljike koje dobijemo iz mladih zaperaka ili zrelih (zimskim, odrvenjelim) reznicama i heterovegetativnim načinom (ksenovegetativno, cijepljenje, kalemljenje). Drugi nespolni način je razmnožavanje tehnikama mikropropagacije, kulturom tkiva ili *in vitro*. Vrste roda *Paulownia* ne mogu se razmnožavati dijeljenjem, običnim ili lučnim polijeganjem, polijeganjem u jarak ili kineskim polijeganjem, složenim ili zmijolikim (valovitim) polijeganjem.

Razmnožavanje reznicama iz lista ili dijela lista te lista i pupa još nije dovoljno istraženo, iako se smatra da se može razmnožiti reznicama od dijela lista s pupom. Drvodelić, 2018a. navodi da postoje dvije najučinkovitije nespolne metode razmnožavanja paulovnije.

Prva, tradicionalna metoda, je tehnika makropropagacije korjenovim reznicama (Slika 9.), a druga, suvremenija metoda je tehnika mikropropagacije u kulturi tkiva (*in vitro*).

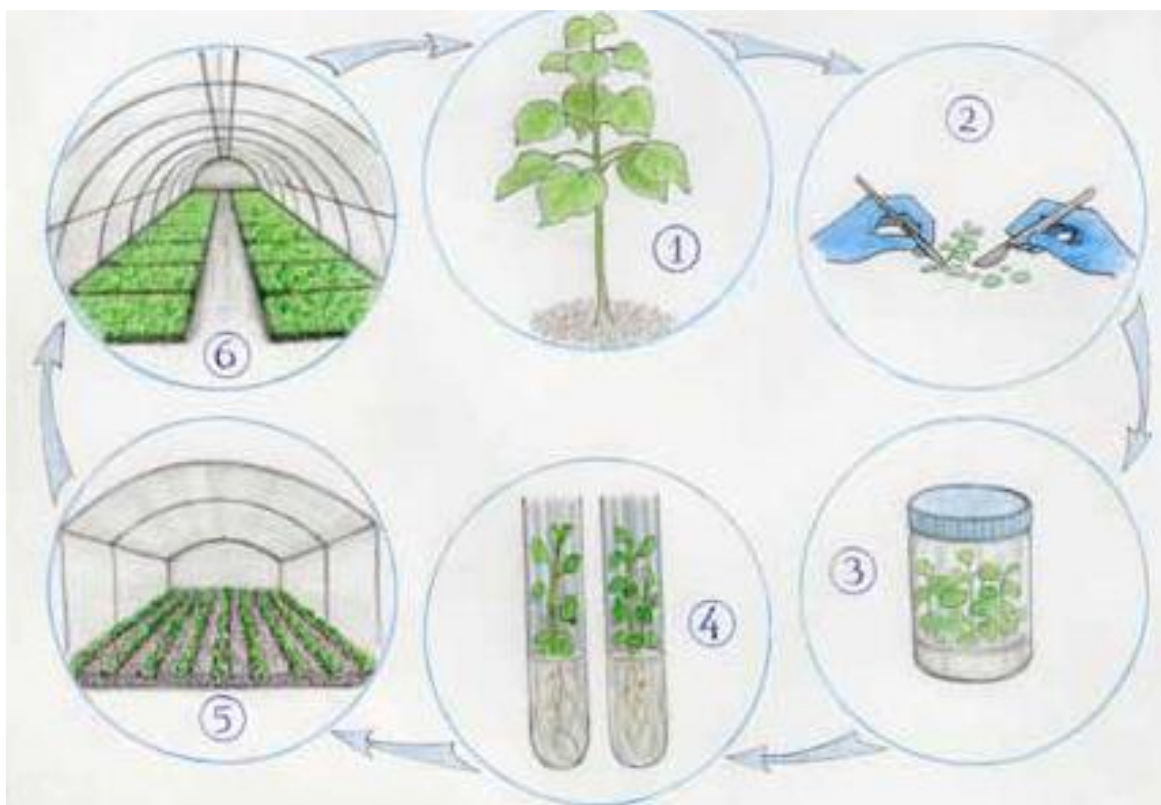


**Slika 9.** Korijenske reznice paulovnije prije i nakon rizogeneze, shema razmnožavanja korijenskim reznicama (Izvor: Drvodelić, 2018b.)

### 2.5 Razmnožavanje paulovnije kulturom tkiva *in vitro* (mikropropagacija)

Tehnika kulture *in vitro* razmnožavanja biljaka pripada skupini nespolnog, vegetativnog ili aseksualnog razmnožavanja tehnikom mikrorazmnožavanja što podrazumijeva da se koristi vrlo mali vegetativni dio majčinske biljke koji se stavlja u proces razmnožavanja. Riječ je zapravo o klonskom razmnožavanju biljaka u sterilnim uvjetima *in vitro*.





**Slika 10.** Faze razmnožavanja paulovnije kulturom tkiva *in vitro* (Izvor: Drvodelić, 2018b)

Ovom metodom omogućava se multiplikacija ishodišnog materijala bez opasnosti od zaraza s ciljem dobivanja velikog broja zdravih uniformnih biljaka koje će biti pogodne za daljnju multiplikaciju ili za razvoj na vlastitom korijenu ovisno o cilju proizvodnje. Kod *in vitro* metode, uvjeti za rast i razvoj presadnica su strogo ograničeni. Na vrlo malom prostoru moguće je proizvesti veliki broj sadnica od samo jedne matične biljke (Drvodelić, 2018b.).

Biljno tkivo za razmnožavanje uzima se s matične biljke koja može rasti bilo gdje. U odnosu na razmnožavanje korijenskim reznicama, kod *in vitro* razmnožavanja nije nam potreban matičnjak. Komadići tkiva (eksplantati) izrezuju se iz matične biljke. Oni se donose u laboratorij za *in vitro* razmnožavanje. Dio biljke koji se izolira i uvodi u kulturu, bez obzira od kojeg se tkiva sastoji, nazivamo eksplantat. Eksplantati se uzgajaju na krutim hranjivim podlogama. Organizirani rast javlja se kada se iz organiziranih dijelova biljke kao što su vršni meristemski izdanak ili korijen, lisni zamci, nodijalni segmenti, mladi cvjetni pupovi uvedu u kulturu tkiva (Slika 10.). Pojam kultura organa obuhvaća aseptično izdvajanje iz čitave biljke određenih kultura. One se razlikuju i o vrsti eksplantata. Postoji

više kultura koje se trenutno rade u Republici Hrvatskoj kad je riječ o paulovnji: kultura embrija, kultura meristema, kultura vegetativnog vrška izdanaka (zakorijenjavanja) i kultura pojedinačnog nodija. Svi postupci u kulturi *in vitro* moraju se odvijati u strogo sterilnim uvjetima. Sterilizacija osigurava oslobađanje okoline, predmeta i slično od mikrobnog onečišćenja. Jedan od ključnih premisa kulture *in vitro* jest da eksplantirana biljna tkiva i stanice prije unošenja na umjetnu podlogu *in vitro* moraju biti sterilni tj. oslobođeni mikroorganizama. Nakon takve sterilizacije tkivo se obrađuje, tj. reže na odgovarajuće dijelove, komadiće i sl. u sterilnim uvjetima upotrebom sterilnih instrumenata. Eksplantati paulovnije sa matične biljke uzgajaju se *in vitro* na hranidbenim podlogama. Uspješnost kulture tkiva ovisi o sastavu hranidbene podloge. Za *in vitro* proizvodnju paulovnije potrebno je imati 3 različite podloge: 1. hranjiva podloga za uvođenje u kulturu tkiva, 2. podloga za multiplikaciju, 3. podloga za ukorjenjivanje.

Nakon faze multiplikacije biljke se prenose na podlogu za ukorjenjivanje. Biljke na hranjivim podlogama ukupno ostaju 3 do 4 tjedna, te nakon toga slijedi postupak aklimatizacije. Aklimatizacija je postupak postupnog prilagođavanja biljaka iz *in vitro* na vanjske uvjete *ex vitro* uzgoja. Biljke paulovnije sade se u sterilni supstrat fine strukture. Postupak aklimatizacije traje četiri tjedna. Krajem prvog tjedna obavlja se preventivna zaštita insekticidima. Krajem drugog i trećeg tjedna obavlja se folijarna prihrana i po potrebi orošavanje. Nakon završetka postupka aklimatizacije, sadnice visine 5-6 cm premještaju se u plastenik na daljnji rast. Nakon razdoblja rasta u plasteniku sadnice se koriste za sadnju na plantaže ili za bilo koje druge namjene (Drvodelić, 2018a.).

## **2.6. Dosadašnja istraživanja na paulovnji u *in vitro* kulturi tkiva**

Paulovnja predstavlja biljnu vrstu na kojoj su obavljena mnogobrojna znanstvena istraživanja vezana za kulturu tkiva. *In vitro* propagacija paulovnije rezultirala je sve većom potražnjom za vrhunskim sadnim materijalom. Objavljeni znanstveni radovi o mikropropagaciji paulovnije uključuju istraživanja o pravilnom odabiru eksplantata, sastavu makronutrijenata i mikronutrijenata (medija), primjeni odgovarajućih regulatora rasta - hormona, antioksidanata, aditiva i adsorbanata tijekom *in vitro* kulture tkiva (Kumarmangalam Yadav i sur., 2013).

**Tablica 1.** Kronološki pregled istraživanja u *in vitro* kulturi tkiva paulovnije (Izvor: Kumarmangalam Yadav i sur., 2013.)

Vrsta	Tip eksplantata	Medij	Učvršćivač	Auksini	Citokinini	Tip mikropropagacije	Reference
<i>P. tomentosa</i>	Nodij	MS	Agar	IBA: 1 mg/L		Ukorjenjivanje	Bahri i sur., 2013
<i>P. tomentosa</i>	Nodij	MS	Agar	IBA: 0-1 mg/L	BAP: 0-2 mg/L	Pupovi, ukorjenjivanje	Bahri i Bettaieb, 2013
<i>P. elongata</i>	List, petiola, internodij	MS	Agar	NAA: 0-1 mg/l	BA: 0-10 mg/L	Direktna organogeneza	Castillo-Martinez i sur., 2012
<i>P. tomentosa</i>	Izdanak	MS	Agar (sigma)	NAA: 1.1 µM; IAA: 1.1-11.4 µM	BA: 0.88 i 8.9 µM	Indukcija adventivnih izdanaka	Corredoira i sur., 2008
<i>P. tomentosa</i>	Sjeme	MS	Agar		BA: 5 mg/L	Proizvodnja sadnica	Celik i sur., 2008
<i>P. kawakamii</i>	Izdanka	MS	Agar	NAA: 0.5-1 mg/L; IBA: 0.5-1 mg/L; IAA: 0.5-1 mg/L	BA: 0-6 mg/L	Indukcija izdanaka	Lobna i sur., 2008
<i>P. tomentosa</i>	Sjeme	MS i ½ MS	Agar (Difco-bacto)			Proizvodnja sadnica	Ozaslan i sur., 2005
	Sadnica, izdanak, korijen, list s petiolom i nodij	MS	Agar (Difco-bacto)	IAA: 0-2 mg/L; NAA: 0-2 mg/L	BAP: 0-7 mg/L; Kinetin: 0-7 mg/L	Indukcija izdanaka	Ozaslan i sur., 2005
<i>P. elongata</i>	List, internodij	MS	Agar	NAA: 0.1, 0.5 mg/L; IAA: 1-4 mg/L	BA: 1-4 mg/L; Kinetin: 0.5-2.5 mg/L	Indirektna somatska embriogeneza	Ipecki i Gozulirmizi, 2005
<i>P. elongata</i>	List, internodij	MS	Phytigel	2,4-D: 1-4 mg/L	BA: 0.1-1 mg/L; TDZ: 1-4 mg/L; Kinetin: 0.1-2 mg/L	Direktna somatska embriogeneza (indukcija kalusa)	Ipecki i Gozulirmizi, 2003
<i>P. fortunei</i>	Izdanak	MS: ½ MS; ¼ MS		NAA: 0.1-1.0 mg/L	BA: 0.11-4.0 mg/L	Indukcija izdanaka; rizogeneza	Sharma i sur., 2003
<i>P. fortunei</i>	Nodij s lišćem, aksilarni pup	MS, ½ MS	Agar	IBA: 0.3 mg/L	BA: 0.3 mg/L	Indukcija izdanaka	ShaValli Khan i sur., 2003
<i>P. fortunei</i> ; <i>P. kawakamii</i> ;	Sjeme, sadnica, izdanak, list,	MS tekući	-	2,4-D: 1.0 mg/L; NAA: 2.5 mg/L	Kinetin: 1.0 mg/L; BA: 2.5 mg/L	Kultura stanica	Ho i Chang, 2002

<i>P. tomentosa</i> ; <i>P. taiwaniana</i>	hipokotil						
<i>P. elongata</i>	List, list s petiolom, nodij, internodij	MS; WPM	Agar	NAA: 0.1-0.5 mg/L; IAA: 0.1-2.0 mg/L	BAP: 0.1-2.0 mg/L	Indukcija izdanaka	Ipecki i sur., 2001
<i>P. tomentosa</i> ; <i>P. australis</i> ; <i>P. fortunei</i> ; <i>P. elongata</i> ; <i>P. tomentosa x fortunei hybrid</i>	List	½ MS; MS; B5; N6	Agar	NAA: 0.1-1.1 mg/L	BA: 2-12 mg/L	Indukcija kaulsa; indukcija izdanaka; rizogeneza	Fan i sur., 2001
<i>P. tomentosa</i>	Nodij	MS	Agar	IAA: 0-1.42 µM IBA: 0-1.32 µM NAA: 0-1.34 µM	BA: 0-8.88 µM; Kinetin: 0-9.3 µM; Ads: 0-148 µM	Indukcija izdanaka; multiplikacija izdanka; rizogeneza	Rout i sur., 2001
<i>P. fortunei</i>	Nodij juvenilnog izdanka	MS; ½ MS	Agar	NAA: 0.1 mg/L	BAP: 0.1-2 mg/L; Kinetin: 0.1 mg/L	Indukcija izdanaka; indukcija kalusa	Venkateswarlu i sur., 2001
<i>P. elongata</i>	Izdanak	MS	Agar	NAA: 0.2 mg/L IBA: 0.4 mg/L	BA: 4.0 mg/L	Rizogeneza	Bergmann i Whetten, 1998
<i>P. fortunei</i>	List s petiolom	MS	Oxiodbacto-agar	NAA: 4 µM IAA: 10 µM	BA: 20 µM i 50 µM	Indukcija izdanaka	Kumar i sur., 1998
<i>P. taiwaniana</i>	Nodij	MS; ½ MS	Polu tekući i tekući medij	IAA: 1-4 mg/L NAA: 1-4 mg/L 2,4-D: 1-4 mg/L	BA: 1-4 mg/L Kinetin: 1-4 mg/L	Organogeneza	Ho i sur., 1997
<i>Paulownia spp.</i>	List s petiolom	MS	Agar	IAA: 0-50 µM NAA: 0-50 µM 2,4-D: 0-50 µM	BA: 0-50 µM Kinetin: 0-50 µM	Indukcija izdanaka	Rao i sur., 1996
<i>P. taiwaniana</i>	Pregledni rad (Review)	-	-	-	-	-	Yang i sur., 1996

<i>P. fortunei</i> ; <i>P. kawasamii</i> ; <i>P. tomentosa</i> ; <i>P. taiwaniana</i>	Kotiledon, hipokotil, izdanak, nodij, internodij, list	MS	Difco Agar; Biolab Agar	NAA: 0.5-2.5 mg/L	BA: 0.5-2.5 mg/L	Indukcija izdanaka	Ho i sur., 1995
<i>P. fortunei</i>	Sjeme, sadnica, list	MS	Oxoidbacto-agar	NAA: 0-50 µM	BA: 0-50 µM	Indukcija izdanaka; rizogeneza; indukcija kalusa	Rao i sur., 1993
<i>P. catalpifolia</i>	Meristem, izdanak	MS; BTM; ½ BTM	Agar	NAA: 0-1 mg/L	Kinetin: 0-8 mg/L; BAP: 1 mg/L	Indukcija izdanaka	Song, i sur., 1991
<i>P. catalpifolia</i>	Meristem, izdanak	MS, BTM, ½ BTM, WPM	Agar	IBA: 0-4 mg/L	BAP: 0-16 mg/L	Indukcija izdanaka	Song, i sur., 1990
<i>P. taiwaniana</i>	Meristem, izdanak	MS; ½ MS, 1/3 MS	Agar	NAA: 0-4 mg/L IBA: 0-4 mg/L	BAP: 0.1-15 mg/L; Kinetin: 0.1-15 mg/L	Indukcija izdanaka	Yang, i sur. 1989
<i>P. tomentosa</i>	Hipokotil s <i>in vitro</i> biljaka	½ MS, MS	Agar	IAA: 17.1 µM IBA: 0.49 µM	Kinetin: 14 µM	Kalus, izdanci	Jagannathan i Marcotrigiano, 1986
<i>P. tomentosa</i>	Nodij	½ MS	Agar	NAA: 0.1-1 mg/L; IBA: 0.5-1.0 mg/L	BAP: 1-10 mg/L	Indukcija izdanaka	Burger i sur., 1985
<i>P. tomentosa</i>	Kotiledon, hipokotil, izdanaka	MS	DifcoBacto Agar	IBA: 0.1-1.0 mg/L	BA: 1.0 mg/L GA <sub>3</sub> : 0.1 mg/L	Indukcija izdanaka; rizogeneza	Marcotrigiano i Stimar, 1983
<i>P. tomentosa</i>	Oplodena jajna stanica, embrio	MS	Agar	2,4D: 1 mg/L IAA: 1 mg/L NAA: 1 mg/L	Kinetin: 1 mg/L	Embriogeneza	Radojević, 1979

\*Legenda: MS - Murashige i Skoog medij (1962), 1/2 MS - 1/2 koncentracije medija Murashige i Skoog, WPM - Woody Plant medij (Lloyd i McCown, 1981), B5: Gamborg's B5 medij (1968), N6: Chu's N6 medij (1975), BTM: Broad Leaf medij (Chalupa, 1981), Kinetin, BAP/BA: 6-Benzilaminopurine, TDZ: Tiazuron, AdS: Adenin sulfat, IBA: Indole-3-butrična kiselina, IAA: Indole-3-octena kiselina, NAA: 1-Naftal octena kiselina, 2,4-D: 2, 4-Diklorofenoksi octena kiselina.

Kao što je vidljivo u tablici 1. istraživanja se provode na brojnim vrstama iz porodice Paulownia poput: *P. catalpifolia*, *P. elongata*, *P. fortunei*, *P. kawakamii*, *P. taiwaniana* i *P. tomentosa*. Većina istraživanja bazira se na nodijalnom tipu eksplantata. Od korištenih podloga najčešće se upotrebljavaju vrlo poznate formulacije medija: MS (Murashige i Skoog, 1962) i WPM (Lloyd i McCown, 1981). Među raznim ispitivanim regulatorima rasta, odnosno hormonima najčešće se govori o uporabi citokinina: BAP, razne kombinacije koncentracija TDZ, kinetina te auksina: IAA, NAA i IBA. Ukorjenjivanje paulovnije *in vitro* vrlo je jednostavno pošto se mikroreznice vrlo uspješno i učinkovito ukorjenjavanju u MS mediju bez upotrebe hormona auksina. Pojedine vrste tijekom kulture *in vitro* razviju vitrificirane, odnosno hiperhidrirane eksplantate koji imaju vrlo lošu adaptibilnost na *ex vitro* uvjete aklimatizacije (Ho i Jacobs, 1995). Također poznata su i uspješna istraživanja na fotoautotrofnom načinu ishrane u *in vitro* uvjetima (Kozai i Kubota, 2001; ShaValli Khan i sur., 2003).

## **2.7. Upotreba suvremenog TIB sustava u kulturi tkiva paulovnije**

Vrlo je malo znanstvenih radova objavljeno na ovu aktualnu temu uporabe imerznih sustava nove generacije, odnosno bioreaktora (TIB / TIS) u mikropropagaciji paulovnije. U cilju još veće učinkovitosti i masovnosti, posljednjih godina veliku ekspanziju ima reprodukcija klonskog materijala u bioreaktorima nove generacije. TIB (eng. „*Temporary Immersion Bioreactor*“) sustav, odnosno imerzni bioreaktori predstavljaju visoko modularni biotehnološki sustav koji 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 *ex vitro*. 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 osigurava repromaterijal deklarirane kvalitete po povoljnijim cijenama. Iako je naglašeno smanjenje troškova proizvodnje i povećana učinkovitost, navedeni sustav zahtijeva naročitu pozornost u poštivanju protokola i kontroli aseptičnih uvjeta pri manipulaciji s biljnim materijalom. Kako je tehnologija nova i podložna brojnim modifikacijama, neprestano se radi na poboljšanju laboratorijskih protokola za komercijalni uzgoj sve većeg broja biljnih kultura (Stanisavljević i sur., 2017).

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija

Ovaj ovog diplomski rad usmjeren je na ispitivanje mogućnosti optimizacije protokola mikropropagacije paulovnije *in vitro* na klasičnom polučvrstom mediju u komparaciji sa suvremenim imerznim bioreaktorima (TIS/TIB sustav) nove generacije koji koriste tekući medij.

Istraživanje je provedeno u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva na Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (Laboratorij za voćarstvo) pri Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. Na katedri se obavljaju brojna *in vitro* istraživanja na mnogim voćnim vrstama poput maline, borovnice, lijeske, oraha, vegetativnih podloga, trešnje, višnje, podloga za citruse, goji, itd.

Uz znanstveno istraživački rad i edukaciju studenata Katedra se bavi i proizvodnjom certificiranog voćnog sadnog materijala. Laboratorij posjeduje svu potrebnu opremu za uspješno provođenje mikropropagacije, matični biljni materijal, TIB sustav (Slika 11.), prostor za aklimatizaciju i klima komoru s kontroliranim uvjetima.



**Slika 11.** Suvremeni imerzni sustav bioreaktora TIB/TIS, Laboratorij za voćarstvo – FAZOS (Foto: Bošnjak, 2019.)

### 3.2. Biljni materijal u istraživanju

U ovom istraživanju korišten je biljni materijal neinvazivnog kultivara paulovnije Bellissia uveden u kulturu tkiva prethodnih godina na kojem se vrše brojna istraživanja (Slika 12.).

Paulovnja Bellissia je nastala križanjem *Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata* te je dobiven hibrid F1 generacije. Hibrid je ponovno križan s *Paulownia elongata* te je dobiven hibrid F2 generacije. On je registriran pod imenom paulovnja Bellissia te nije genetski modificiran. Geni su deponirani u banci gena kod međunarodnog patentnog zavoda u Nizozemskoj, zaštićeno pravo oplemenjivačkog Instituta Biotree iz Sofije, Bugarske. Sjeme joj je sterilno i na taj se način ne može razmnožavati. Ne pripada grupi invazivnih vrsta.

Paulovnja Bellissia posjeduje gene koji su objedinili svojstva dvije vrste. Od *P. fortunei* je preuzet gen vezan za ekstremne uvjete niskih temperatura (do  $-26^{\circ}\text{C}$ ), kao i celulozni energetska dio. Sve ostalo je zadržano od *P. elongata* a to je brz rast, kvaliteta drvene mase i univerzalna upotreba. Posebno se ističe kalorična vrijednost koja je ravnomjerna najkvalitetnijem ugljenu. U Kyoto programu stakleničkih jedinica ista je stavljena na prvo mjesto kao rudnik kisika i čistilac zraka jer pripada grupi C-4 fotosinteze.

Paulovnja Bellissia je listopadno rastuće drvo, a poznato je i kao carsko drvo, zmajevo drvo, smaragdno drvo. Paulovnja se pokazala i kao svjetski rekorder u apsorpciji CO<sub>2</sub> te proizvodnji kisika. Sadnjom paulovnije Bellissie, najbržeg rastućeg drveta, možemo nadoknaditi kašnjenje u pošumljavanju. Za 8 do 9 godina paulovnja dostiže debljinu do 40-50 cm i visinu od 15 do 20 metara. Upravo tada stablo je zrelo kao tehničko drvo, dok se kao celulozna sirovina može sjeći i za 3 godine poslije sadnje. Osim toga paulovnja Bellissia zadovoljava i estetske kriterije: lišće dostiže promjer i do 60 cm, pogodno je za ishranu životinja, a cvijet koji je ljekovit privlači i pčele (pčelinja paša). Posebno je važno da se stablo poslije siječe samo obnavlja iz izdanka. Ministarstvo zaštite okoliša i prirode izdalo je dopuštenje za “stavljanje na tržište i/ili uvođenje u prirodu strane vrste paulovnije Bellissia” koji navodi da se radi o dvostrukom hibridu s znanstvenim nazivom *Paulownia elongata* F2. Za ovaj hibrid je nadležna stručna institucija u redovnom upravnom postupku utvrdila da ne postoji ekološki rizik od njezina stavljanja na tržište i uvođenja u prirodu.





**Slika 12.** Kultivar u istraživanju – *in vitro* paulovnja Bellissia / *Paulownia elongata* F2  
(Foto: Bošnjak, 2019.)

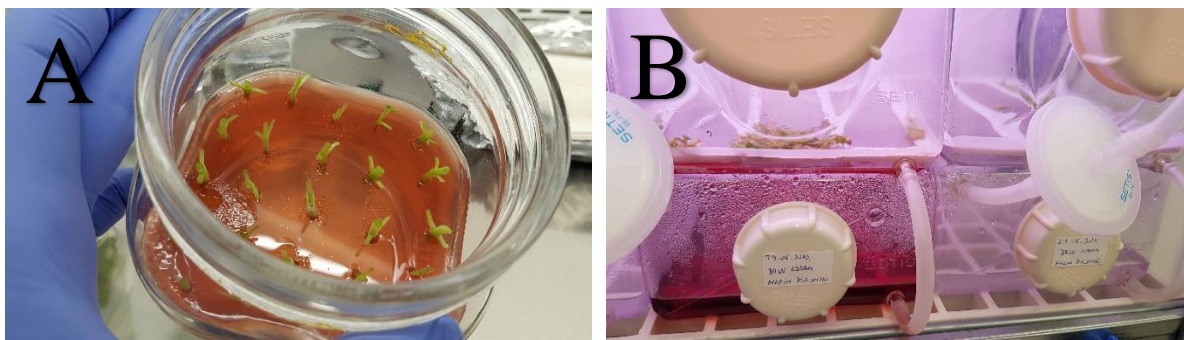
### 3.3. Tretmani u istraživanju

U ovom istraživanju korištena je standardna hranjiva podloga DKW (Driver i Kaniyuki, 1984) proizvođača Duchefa Biochemie iz Nizozemske koja sadrži zadane makro i mikro nutrijente, te vitamine. Detaljni sastav hranjive podloge opisan je u tablici 2. Modifikacija DKW medija uključivala je aplikaciju dva različita kelatna oblika željeza koji su predstavljali tretmane FeNaEDTA 44,64 mg/l i FeEDDHA 118,00 mg/l (Tablica 3.). Svi mediji sadržavali su podjednaku koncentraciju citokinina BAP (6-benzilaminopurin) i auksina IBA (indol-3-butrična-kiselina). Koncentracija BAP-a iznosila je 0,8 mg/l te IBA 0,01 mg/l, pH vrijednost medija prije autoklaviranja podešena je na 5,8. Od ostalih komponenti medij je sadržavao 30 g/l šećera te polučvrsti medij 6,5 g/l agara.

Izvršena je komparacija tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) unutar konvencionalnog *in vitro* modela koji koristi polučvrsti medij i suvremenog imerznog TIB sustava koji koristi tekući hranjivi medij. Također provjerena je i učinkovitost ispitivanih modela (polučvrsti vs. tekući).

Biljni materijal je diseciran na nodijalne segmente s dva bočna aksilarna pupa te su na istom uklonjeni listovi. Svaka teglica sadržavala je 100 ml polučvrstog medija s po 25

eksplantata, dok je bioreaktor sadržavao 500 ml tekućeg medija također sa po 25 eksplantata (Slika 13.). Pokus je postavljen po blokom rasporedu (4 repeticije) tako da je svaki tretman uključivao 4 teglice, odnosno bioreaktora sa po 25 eksplantata. Ukupno: 4 teglice i 4 bioreaktora x 2 tretmana = 8 teglica i 8 bioreaktora x 25 eksplantata = 400 biljaka (100 biljaka po tretmanu). Frekvencija imerzije na kontrolnoj jedinici TIB sustava postavljena je na 1 puta u danu (svakih 24 sati po 3 minute) s ventilacijom sustava svaka 3 sata (trajanje 2 minute).



**Slika 13.** Eksplantati na polukrutom mediju u teglici (A) i (B) tekućem mediju u bioreктору (Foto: Bošnjak 2019.)

**Tablica 2.** Sastav korištene hranjive podloge DKW (Izvor: Duchefa Biochemie, 2012.)

#### MICRO ELEMENTS

	mg/l	µM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25	1.00
FeNaEDTA	44.63	121.61
$\text{H}_3\text{BO}_3$	4.80	77.63
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	33.80	200.00
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.39	1.61
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	17.00	72.19

#### MACRO ELEMENTS

	mg/l	mM
$\text{CaCl}_2$	112.50	1.01
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1664.64	8.30
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	265.00	1.95
$\text{K}_2\text{SO}_4$	1559.00	8.95
$\text{MgSO}_4$	361.49	3.00
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1416.00	17.70

Total concentration Micro and Macro elements: 5479.50 mg/l

#### VITAMINS

	mg/l	µM
Glycine	2.00	26.64
myo-Inositol	100.00	554.94
Nicotinic acid	1.00	8.12
Thiamine HCl	2.00	5.93

**Tablica 3.** Tretmani u pokusu

Medij	Kelatni oblik željeza	Sustav i konzistencija medija
DKW	FeNaEDTA	<i>Polučvrsti (konvencionalni) / Tekući (TIB)</i>
DKW	FeEDDHA	<i>Polučvrsti (konvencionalni) / Tekući (TIB)</i>

Kompletna oprema, skalpeli, pincete, teglice, filteri, crijeva, bioreaktori za biljke i medij koji su korišteni u ovom istraživanju sterilizirani su u autoklavu na 121 °C u trajanju od 20 min pri tlaku od 1,2 bara. Radni prostor unutar laminarnog stola steriliziran je 70% etanolom i tretiran UV lampom u trajanju od 30 minuta. Hranjivi medij unutar bioreaktora dodan je u volumenu od 0,5 litara, a svaka teglica je napunjena sa 100 ml medija nakon čega se pristupilo autoklaviranju, odnosno sterilizaciji istog. Tretmani na tekućem mediju nisu sadržavali agar. Nakon završetka uvođenja eksplantata na sve tretmane (teglice i bioreaktori) isti su postavljeni u klima komoru pod režim svjetlosti 16/8 i temperaturu od 23 °C.

### 3.4. Mjerenja u istraživanju

Nakon 30 dana, odnosno na kraju proizvodnog ciklusa pristupilo se mjerenju morfoloških parametara na svim tretmanima (Slika 14.) te je izvršeno mjerenje dinamike kretanja pH u tekućem mediju neposredno prije (0 dan) i nakon završetka ciklusa (30 dana).

U ovom istraživanju promatrali smo utjecaj tretmana na sljedeće morfološke parametre:

- veličina izdanka,
- broj nodija
- broj listova
- širina lista
- dužina lista
- broj izdanaka



**Slika 14.** Mjerenja u istraživanju (Foto: Bošnjak, 2019.)

### **3.5. Obrada podataka**

Obrada podataka provedena je statističkim metodama pomoću računalnog programa Microsoft Office Excel 2013., te SAS softwarea 9.3. Od statističkih metoda korištena je analiza varijance (ANOVA) i statistički testovi značajnosti (F-test i Fisher LSD) pri vrijednosti razine od  $p \leq 0.05$ .

#### 4. REZULTATI

Na razini cijelog pokusa (Tablica 4.) utvrđene su značajne razlike između primijenjenih tretmana i modela mikropropagacije (konvencionalni / TIB). Veličina izdanaka ( $4.84^A$ ) i širina lista ( $1.16^A$ ) pri tretmanu s FeEDDHA bila je značajno veća u odnosu na tretman s FeNaEDTA. Jedino je broj listova ( $10.24^A$ ) pri tretmanu FeNaEDTA bio značajno veći u odnosu na tretman s FeEDDHA. Nema značajne razlike između primijenjenih tretmana u broju nodija, dužini lista i broju izdanaka.

Konvencionalni model, odnosno polučvrsti medij rezultirao je značajno većim izdancima ( $4.84^A$ ), brojem nodija ( $4.64^A$ ) i brojem listova ( $10.61^A$ ) u odnosu na tekući medij. Širina lista ( $1.25^A$ ) i dužina lista ( $1.32^A$ ) značajno je veća kod tekućeg medija. Nema značajne razlike u broju izdanaka između oba primijenjena modela.

Interakcija tretman x model bila je značajna samo za broj listova ( $p \leq 0.0213^*$ ), širina ( $p \leq 0.0008^*$ ) i dužina lista ( $p \leq 0.0008^*$ ).

**Tablica 4.** Statističke razlike na razini pokusa između: tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) i primijenjenog modela *in vitro* (polučvrsti i tekući TIB) te interakcija tretman x model za promatrane parametre uspješnosti mikropropagacije paulovnije Bellissia (veličina izdanaka, broj nodija, broj listova, širina lista, dužina lista i broj izdanaka).

Tretman	Veličina izdanaka	Broj nodija	Broj listova	Širina lista	Dužina lista	Broj izdanaka
<i>FeNaEDTA</i>	3.90 <sup>B</sup>	4.51	10.24 <sup>A</sup>	1.00 <sup>B</sup>	1.06	1.60
<i>FeEDDHA</i>	4.84 <sup>A</sup>	4.33	8.63 <sup>B</sup>	1.16 <sup>A</sup>	1.17	1.50
<i>F-test</i>	15.03	0.93	6.88	7.41	2.74	0.58
<i>P</i>	0.0002*	0.3385	0.0102*	0.0077*	0.1011	0.4494
Model						
<i>Polučvrsti konvencionalni</i>	4.84 <sup>A</sup>	4.64 <sup>A</sup>	10.61 <sup>A</sup>	0.91 <sup>B</sup>	0.90 <sup>B</sup>	1.64
<i>Tekući TIB</i>	3.90 <sup>B</sup>	4.19 <sup>B</sup>	8.26 <sup>B</sup>	1.25 <sup>A</sup>	1.32 <sup>A</sup>	1.46
<i>F-test</i>	15.29	5.44	14.45	33.02	44.89	1.87
<i>P</i>	0.0002*	0.0218*	0.0003*	<.0001*	<.0001*	0.1748
Interakcija tretman x model						
<i>F-test</i>	2.13	0.02	5.48	12.04	11.99	0.21
<i>P</i>	0.1479	0.8832	0.0213*	0.0008*	0.0008*	0.6496

\*Vrijednosti slovne oznake <sup>A, B</sup> statistički su značajne, razina  $p \leq 0.05$

Unutar tretmana s FeEDDHA zabilježene su značajne razlike u veličini izdanaka, širini i dužini listova između primijenjenih modela mikropropagacije (Tablica 5.). Biljke na tekućem mediju (TIB) inicirale su značajno veće listove (širina 1.43<sup>A</sup> i dužina lista 1.48<sup>A</sup>) dok je na polučvrstom mediju veličina izdanaka (5.49<sup>A</sup>) bila značajno veća. Nisu utvrđene značajne razlike u broju nodija, broju listova i broju izdanaka između primijenjenih modela mikropropagacije unutar tretmana s FeEDDHA.

**Tablica 5.** Razlike između modela (polučvrsti konvencionalni i tekući TIB) unutar tretmana FeEDDHA na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj nodija, broj lista, širina lista, dužina listova i broj izdanaka) kod palulovnije Bellissia.

<i>FeEDDHA</i>	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Broj nodija</i>	<i>Broj listova</i>	<i>Širina lista</i>	<i>Dužina lista</i>	<i>Broj izdanaka</i>
<i>Polučvrsti konvencionalni</i>	5.49 <sup>A</sup>	4.54	9.08	0.89 <sup>B</sup>	0.85 <sup>B</sup>	1.56
<i>Tekući TIB</i>	4.19 <sup>B</sup>	4.12	8.18	1.43 <sup>A</sup>	1.48 <sup>A</sup>	1.44
<i>F-test</i>	11.28	2.36	2.50	38.80	52.00	0.47
<i>P</i>	0.0015*	0.1309	0.1203	<.0001*	<.0001*	0.4955

\*Vrijednosti slovne oznake <sup>A, B</sup> statistički su značajne, razina  $p \leq 0.05$

Unutar tretmana s FeEDDHA zabilježene su značajne razlike u veličini izdanaka, broju listova i dužini lista između primijenjenih modela mikropropagacije (Tablica 6.). Nema značajne razlike u broju nodija, broju izdanaka i širini lista. Biljke na polučvrstom konvencionalnom mediju bile su značajno veće (4.20<sup>A</sup>) i s većim brojem listova (12.14<sup>A</sup>) u odnosu na tekući medij. Dužina lista (1.16<sup>A</sup>) značajno je veća pri tekućem mediju TIB.

**Tablica 6.** Razlike između modela (polučvrsti i tekući TIB) unutar tretmana FeNaEDTA na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj nodija, broj lista, širina lista, dužina listova i broj izdanaka) kod palulovnije Bellissia.

<i>FeNaEDTA</i>	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Broj nodija</i>	<i>Broj listova</i>	<i>Širina lista</i>	<i>Dužina lista</i>	<i>Broj izdanaka</i>
<i>Polučvrsti konvencionalni</i>	4.20 <sup>A</sup>	4.75	12.14 <sup>A</sup>	0.93	0.96 <sup>B</sup>	1.72
<i>Tekući TIB</i>	3.61 <sup>B</sup>	4.27	8.35 <sup>B</sup>	1.07	1.16 <sup>A</sup>	1.48
<i>F-test</i>	4.16	3.10	11.98	2.86	5.20	1.48
<i>P</i>	0.0469*	0.0845	0.0011*	0.0972	0.0270*	0.2290

\*Vrijednosti slovne oznake <sup>A, B</sup> statistički su značajne, razina  $p \leq 0.05$

Razlike između tretmana s FeNaEDTA i FeEDDHA unutar polučvrstog modela bile su značajne za parametar veličina izdanaka i broj listova (Tablica 7.). Tako je tretman koji je uključivao FeEDDHA rezultirao značajno većim izdancima (5.49<sup>A</sup>) u odnosu na tretman s FeNaEDTA. Kontrastno, tretman s FeNaEDTA ispoljio je značajno veći broj listova (12.14<sup>A</sup>). Između ostalih promatranih parametara (broj nodija, širina i dužina lista, broj izdanaka) nije utvrđena značajna razlika.

**Tablica 7.** Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) unutar polučvrstog konvencionalnog *in vitro* modela na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj nodija, broj listova, širina lista, dužina lista i broj izdanaka) kod palulovnije Bellissia.

<i>Polučvrsti konvencionalni</i>	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Broj nodija</i>	<i>Broj listova</i>	<i>Širina lista</i>	<i>Dužina lista</i>	<i>Broj izdanaka</i>
<i>FeNaEDTA</i>	4.20 <sup>B</sup>	4.75	12.14 <sup>A</sup>	0.93	0.96	1.72
<i>FeEDDHA</i>	5.49 <sup>A</sup>	4.54	9.08 <sup>B</sup>	0.89	0.85	1.56
<i>F-test</i>	19.83	0.58	7.75	0.53	2.70	0.80
<i>P</i>	<.0001*	0.4513	0.0077*	0.4705	0.1067	0.3756

\*Vrijednosti slovne oznake <sup>A,B</sup> statistički su značajne, razina  $p \leq 0.05$

Razlike između tretmana s FeNaEDTA i FeEDDHA unutar tekućeg TIB modela bile su značajne za parametar širina i dužina lista (Tablica 8.). Nema značajnih razlika u veličini izdanaka, broju listova, broju nodija i broju izdanaka između primijenjenih tretmana. Jedino je dužina (1.43<sup>A</sup>) i širina lista (1.48<sup>A</sup>) značajno veća pri tretmanu koji je uključivao aplikaciju kelatnog oblika željeza FeEDDHA.

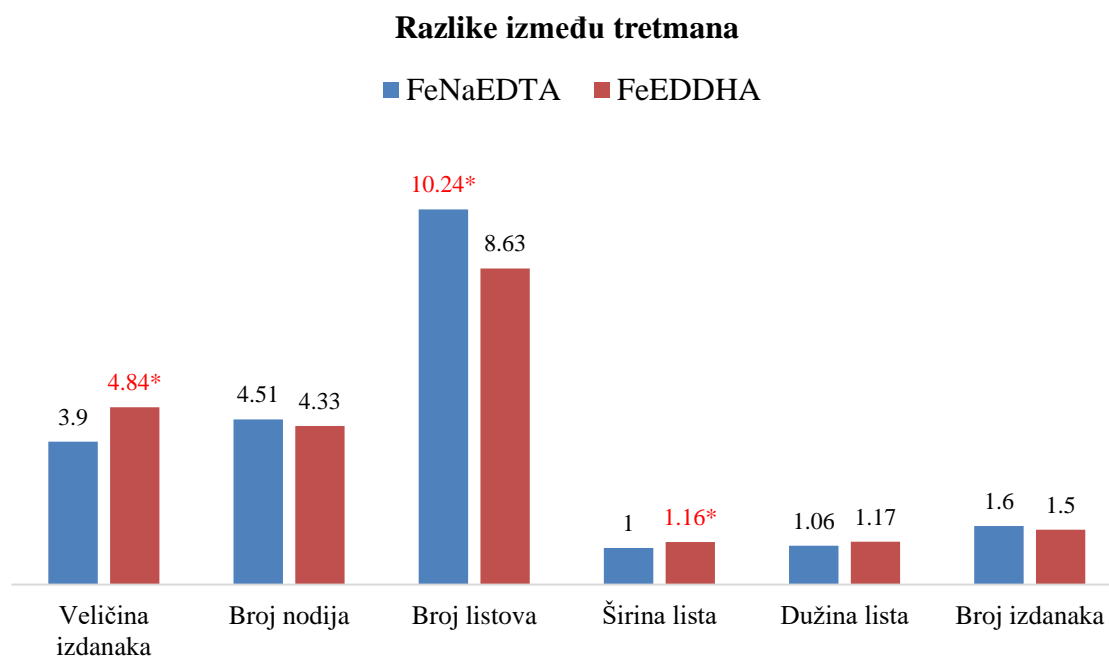
**Tablica 8.** Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) unutar tekućeg TIB modela na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj nodija, broj listova, širina listova, dužina listova i broj izdanaka) kod palulovnije Bellissia.

<i>Tekući TIB</i>	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Broj nodija</i>	<i>Broj listova</i>	<i>Širina lista</i>	<i>Dužina lista</i>	<i>Broj izdanaka</i>
<i>FeNaEDTA</i>	3.61	4.27	8.35	1.07 <sup>B</sup>	1.16 <sup>B</sup>	1.48
<i>FeEDDHA</i>	4.19	4.12	8.18	1.43 <sup>A</sup>	1.48 <sup>A</sup>	1.44
<i>F-test</i>	2.28	0.36	0.10	13.04	9.38	0.04
<i>P</i>	0.1376	0.5537	0.7575	0.0007*	0.0036*	0.8369

\*Vrijednosti slovne oznake <sup>A,B</sup> statistički su značajne, razina  $p \leq 0.05$

## 5. RASPRAVA

Na osnovu dobivenih rezultata ali i vizualno primijećen je razvoj značajno većih izdanaka sa širim listovima pri tretmanu s kelatnim oblikom željeza FeEDDHA (Grafikon 1., Slika 15 i 16). Pozitivne učinke kelatnog oblika FeEDDHA (etilendiamin-di-2-hidroksifenil-acetat) u *in vitro* kulturi tkiva borovnice iznose Shibli i sur., 1997. Ovaj kelatni oblik željeza posjeduje visoku stabilnosti, odnosno postojanost i održavanje konstantne početne ionske ravnoteže u mediju kroz cijeli ciklus kultivacije biljaka *in vitro* (Shibli i sur., 2002). Jedino je broj listova bio značajno veći pri tretmanu s FeNaEDTA. Pretpostavljamo da su biljke na tretmanu s FeNaEDTA nastojale nadoknaditi potrebnu lisnu površinu za proces fotosinteze iniciranjem značajno većeg broja listova koji su bili značajno manji u odnosu na tretman s FeEDDHA. Kelatni oblika željeza FeNaEDTA (etilen-diamin-tetra-acetat) se vrlo brzo razgrađuje u prisutnosti sunčeve svjetlosti (Bucheli-Witschel i Egli, 2001). Neka istraživanja navode i toksičan učinak FeNaEDTA jer uslijed fotolabilnosti slobodni ioni željeza stvaraju aktivni kisik koji izazva destrukciju mnogih komponenata medija (Dunlap i Robacker, 1988; Becana i sur., 1998). Slobodni željezni ioni mogu se istaložiti kao Fe-fosfat, te ga učiniti nedostupnim u mediju, dok sama FeNaEDTA može inducirati proizvodnju formaldehida koji je toksičan za biljne eksplantate (Hangarter i Stasinopoulous, 1991).



**Grafikon 1.** Razlike između primijenjenih tretmana FeNaEDTA i FeEDDHA





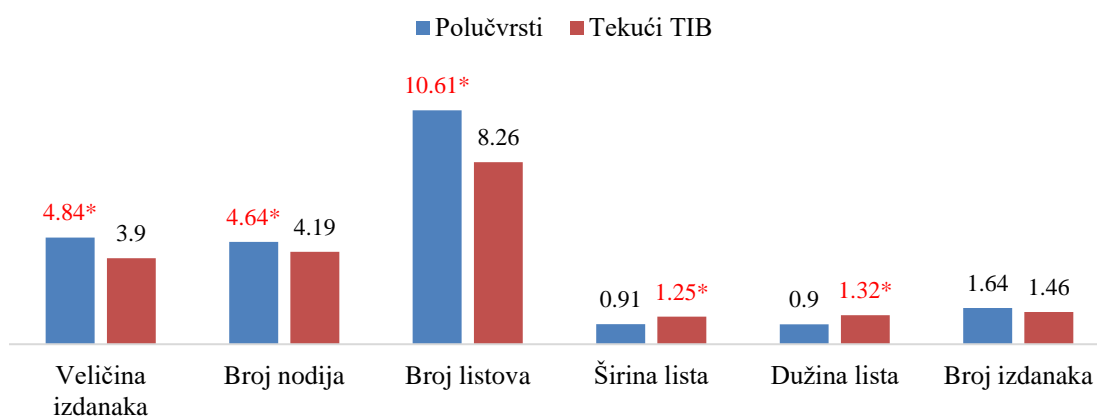
**Slika 15.** Biljke na tretmanu FeEDDHA  
(Foto: Bošnjak, 2019.)



**Slika 16.** Biljke na tretmanu FeNaEDTA  
(Foto: Bošnjak, 2019.)

Biljke na polučvrstom mediju (Grafikon 2., Slika 17) razvile su veće izdanke s većim brojem nodija i listova iako je lisna površina, odnosno širina i dužina lista veća na tekućem mediju (Grafikon 2., Slika 18). Mogući uzrok ove pojave pripisujemo mikroatmosfera unutar posude (bioreaktor s biljkama), odnosno ventilacije i izmjene plinova, vlage i većeg prostora u razvoju. Kontrastno, u teglici mikroatmosfera ostaje „nepromjenjiva“ tijekom cijelog ciklusa te je pretpostavka da biljni materijal uslijed skučenosti prostora i nedostatka ventilacije nastoji prebroditi kritičnu fazu stvaranjem većeg broja manjih listova na nodijima ili bolje rečeno većih izdanaka sa puno sitnijih listova (Slika 17.).

### Razlike između modela



**Grafikon 2.** Razlike između primijenjenih modela – polučvrsti i tekući medij

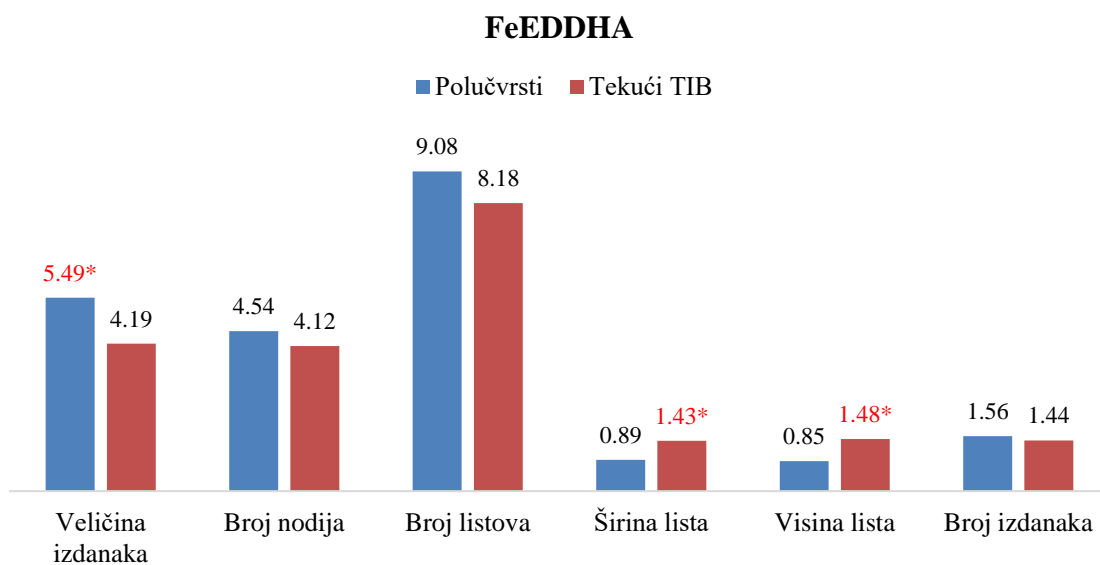


**Slika 17.** Biljka na polučvrstom mediju (Foto: Bošnjak, 2019)



**Slika 18.** Biljka na tekućem mediju TIB (Foto: Bošnjak, 2019)

Biljke na tretmanu koji je uključivao aplikaciju FeEDDHA na polučvrstom mediju inicirale su veće izdanke u odnosu na tekući medij (TIB sustav), dok su biljke na tekućem mediju razvile značajno veće listove (Grafikon 3., Slika 19). Na osnovu dobivenih rezultata zaključujemo da uporabom FeEDDHA biljka stvara veću lisnu masu, odnosno veće listove koji su bili tamno zeleni i vizualno zdraviji u odnosu na listove pod tretmanom s FeNaEDTA. S obzirom na pad pH vrijednosti u tekućem mediju pretpostavka je da je kelatni oblik FeEDDHA pristupačniji biljci u odnosu na kelat FeNaEDTA.

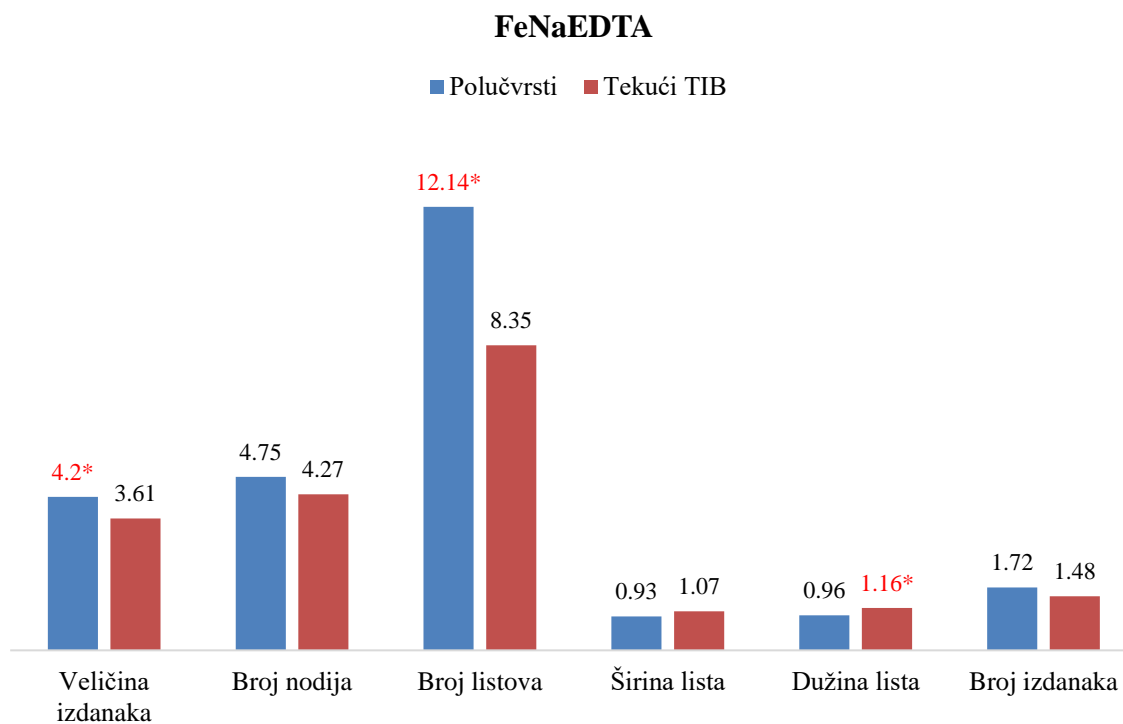


**Grafikon 3.** Razlike između sustava za tretman FeEDDHA



**Slika 19.** Tretman FeEDDHA – A polučvrsti medij, B tekući medij (Foto: Bošnjak, 2019)

Također i biljke unutar tretmana FeNaEDTA na polukrutom mediju inicirale su veće izdanke s većim brojem listova, dok su biljke na tekućem mediju inicirale nešto duže listove (Grafikon 4., Slika 20).

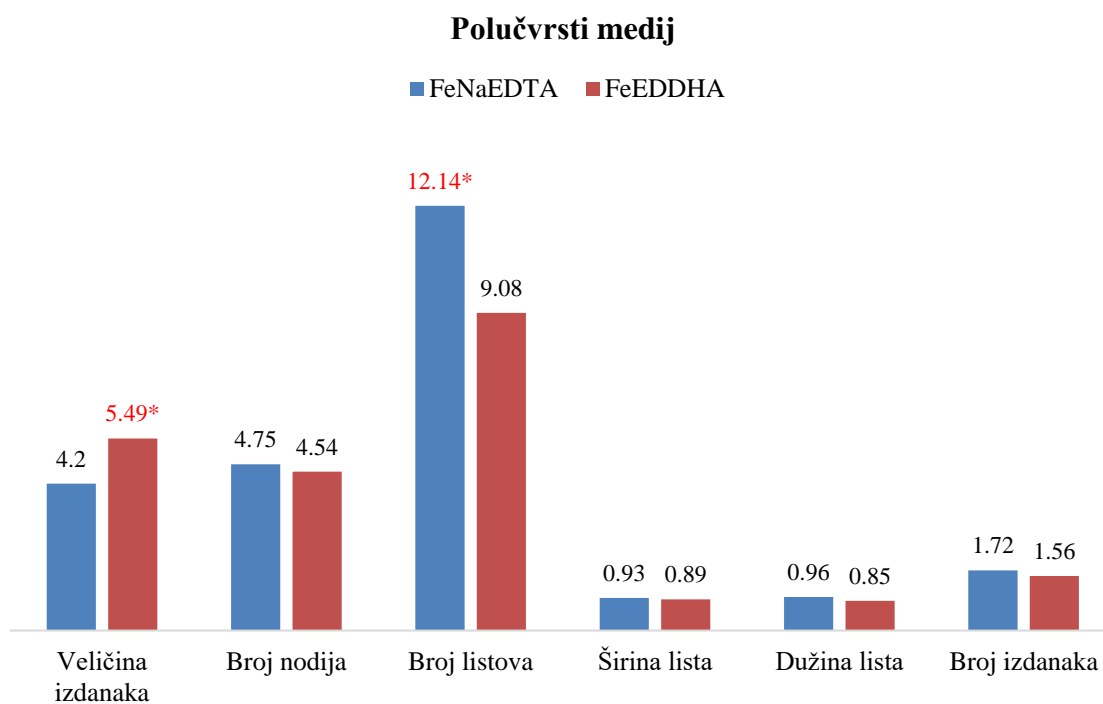


**Grafikon 4.** Razlike između sustava za tretman FeNaEDTA

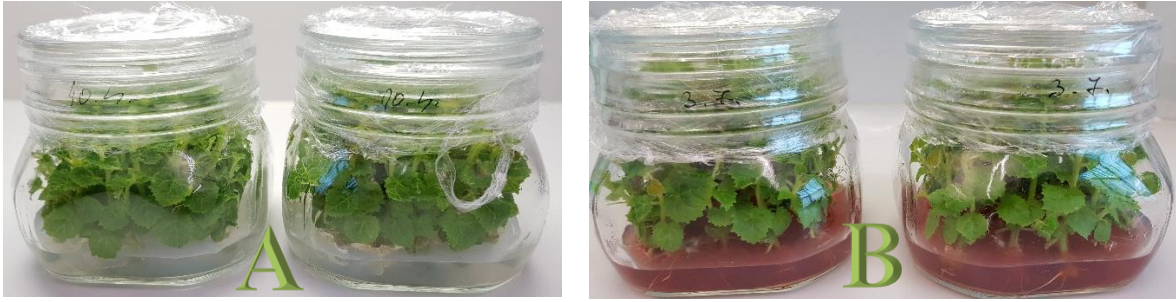


**Slika 20.** Tretman FeNaEDTA – A (polučvrsti medij) i B (tekući medij)  
(Foto: Bošnjak, 2019)

Biljke na polučvrstom mediju koje su bile pod utjecajem tretmana s FeEDDHA razvile su veće izdanke, ali broj listova je bio veći pri biljkama na tretmanu s FeNaEDTA (Grafikon 5., Slika 21).

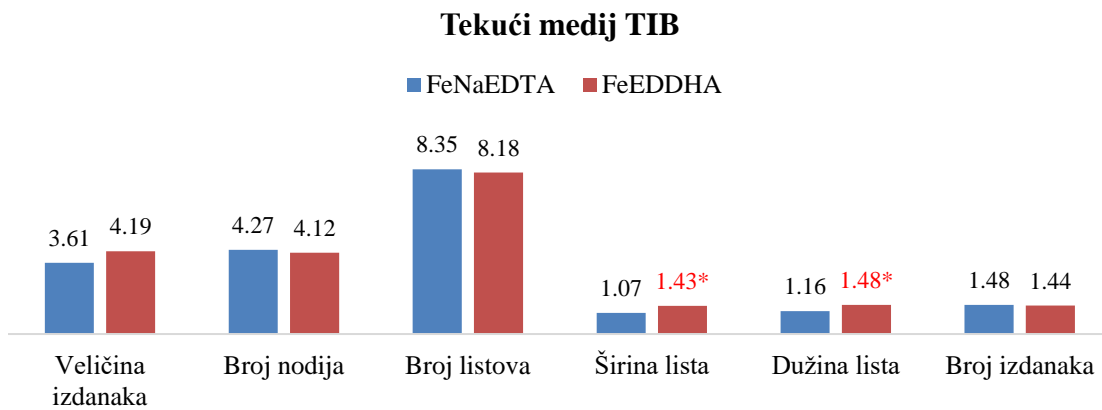


**Grafikon 5.** Razlike između Fe tretmana unutar polučvrstog modela



**Slika 21.** Tretmani s biljkama na polučvrstom mediju – A (FeNaEDTA) i B (FeEDDHA)  
(Foto: Bošnjak, 2019)

Na tekućem mediju biljke na tretmanu s FeEDDHA razvile su veće i krupnije listove (Grafikon 6., Slika 22) u odnosu na tretman s FeNaEDTA.

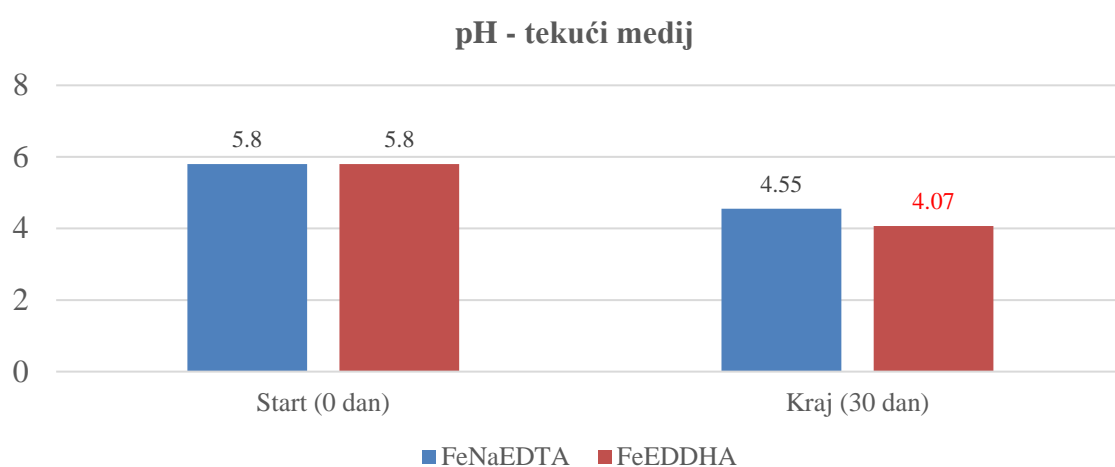


**Grafikon 6.** Razlike između Fe tretmana unutar tekućeg TIB modela

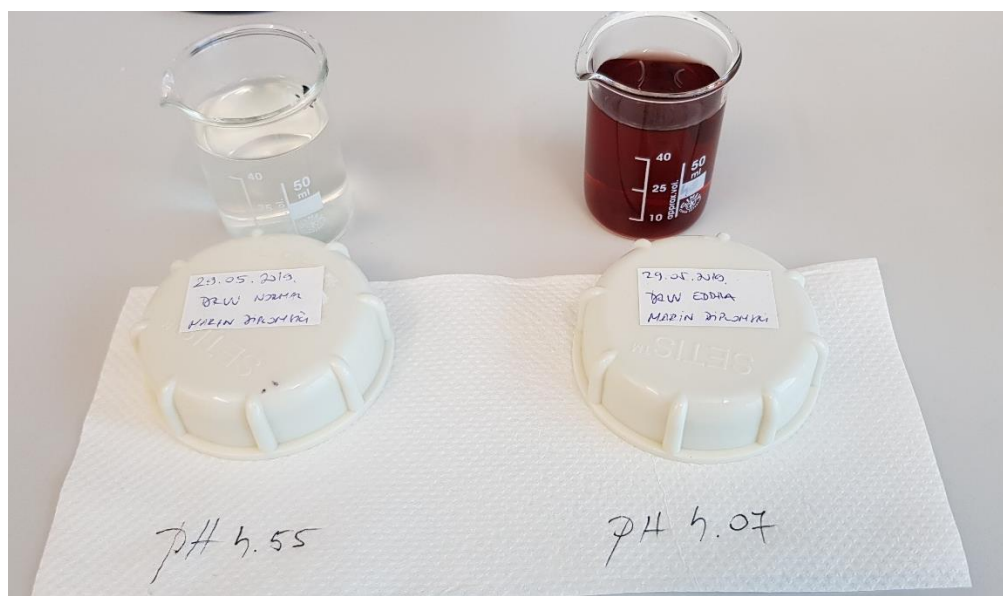


**Slika 22.** Tretmani s biljkama na tekućem mediju – A (FeNaEDTA) i B (FeEDDHA)  
(Foto: Bošnjak, 2019)

Nakon završetka ciklusa, odnosno nakon 30 dana na tekućem mediju primijećen je pad pH vrijednosti na oba primijenjena tretmana s početnih 5,8 (0 dan) na 4,55 - tretmana FeNaEDTA i 4,07 - tretman FeEDDHA (Grafikon 7; Slika 23.). Pretpostavka je kako uslijed imerzije, aeracije ili potapanja biljnog materijala dolazi do pojedinih reakcija mineralnih komponenti medija ali i otpuštanja fenolnih spojeva, etilena i sl. od strane eksplantata (biljaka) posebice u prvim danima kulture te tako utječu na spuštanje početne pH vrijednosti medija. Biljni materijal za svoj rast usvaja pojedine mineralne komponente medija te utječe na smanjenje vrijednosti konduktiviteta i pH. Također ovu pojavu iznose i drugi istraživači poput Pearsson, 2012., te Chakrabarty, i sur., 2007.



**Grafikon 7.** Dinamika kretanja pH vrijednosti na tekućem mediju



**Slika 23.** pH tekućeg medija po tretmanima na kraju ciklusa – 30 dan  
(Foto: Bošnjak, 2019)

## 6. ZAKLJUČAK

Stupanjem na snagu Zakona o drvenastim kulturama kratkih ophodnji koji bi mogao uvrstit paulovnju na listu kultura koje podliježu politici poticaja ukazano je povećani interes novih proizvođača za certificiranim sadnim materijalom provjerene kvalitete.

Prilikom razmnožavanja paulovnije sjemenom uslijed rekombinacije svojstava nove biljke nisu identične majčinskoj biljci, a plantaže podignute s takvim sadnicama rezultiraju lošom produkcijom drvne mase.

Glavni način razmnožavanja paulovnije u rasadnicima je nespolni, odnosno vegetativni. Upotreba suvremene metode, odnosno tehnike mikropropagacije u kulturi tkiva *in vitro* predstavlja imperativ u cilju dobivanja velikog broja ujednačenog, zdravstveno ispravnog i certificiranog sadnog materijala.

Ovim diplomskim radom ispitivana je mogućnost optimizacije protokola razmnožavanja paulovnije (*Paulownia spp.*) kulturom tkiva *in vitro*, odnosno usporedbom konvencionalnog modela proizvodnje na polučvrstom hranjivom mediju s imerznim bioreaktorima nove generacije (TIB/TIS sustav) koji koriste tekući hranjivi medij.

- Svi tretmani, odnosno eksplantati i biljke uspješno su prošli kroz cijeli proizvodni ciklus *in vitro* (30 dana) bez znakova kontaminacije.
- Automatizacija procesa pomoću suvremenih imerznih bioreaktora (TIB sustav) koji koristi tekući medij uvelike se ubrzala i smanjila troškove izbacivanjem agara u potpunom ciklusu mikropropagacije paulovnije.
- Na polučvrstom (konvencionalni sustav) ali i tekućem mediju (TIB sustav) biljke su dostigle odgovarajuću vegetativnu masu neophodnu za daljnju multiplikaciju nakon 30 dana. Frekvencija imerzije sustava koji koristi tekući medij (TIB sustav) 1 puta u danu (svakih 24 sata po 3 minute) s ventilacijom sustava svaka 3 sata (trajanje 2 minute) rezultirala je idealnim razvojem biljnog materijala kroz 30 dana.
- Jedini uočeni nedostatak kod sustava s tekućim medijem je stabilizacija pH, odnosno primijećen je pad početne pH vrijednosti s 5,8 na 4,07 (FeEDDHA) i 4,55 (FeNaEDTA) ali bez primjetnog štetnog utjecaja na biljni materijal u istraživanju. Pretpostavka uzroka opadanja pH je da uslijed imerzije, aeracije ili potapanja biljnog materijala dolazi do pojedinih reakcija i utroška mineralnih komponenti

medija, ali i posljedičnog otpuštanja fenolnih spojeva, etilena i sl. od strane eksplantata (biljaka) u početnim danima kulture.

- Utvrđene su značajne razlike između primijenjenih tretmana (FeNaEDTA / FeEDDHA) i modela mikropropagacije (konvencionalni / TIB).
- Veličina izdanaka i širina lista pri tretmanu s FeEDDHA bila je značajno veća u odnosu na tretman s FeNaEDTA. Dok je broj listova pri tretmanu FeNaEDTA bio značajno veći u odnosu na tretman s FeEDDHA. Nema značajne razlike između primijenjenih tretmana u broju nodija, dužini lista i broju izdanaka.
- Biljke na polučvrstom mediju razvile su veće izdanke s većim brojem nodija i listova iako je lisna površina odnosno širina i dužina lista veća na tekućem mediju. Mogući uzrok ove pojave pripisujemo mikroatmosfera unutar posude (bioreaktor s biljkama), odnosno ventilacije i izmjene plinova, vlage i većeg prostora za razvoj listova. Nema značajne razlike u broju izdanaka između oba primijenjena modela.
- Biljke pri tretmanu koji je uključivao aplikaciju FeEDDHA na polučvrstom mediju inicirale su veće izdanke u odnosu na tekući medij (TIB sustav), dok su biljke na tekućem mediju razvile značajno veće listove (veća biljna masa). Na osnovu dobivenih rezultata zaključujemo da uporabom kelata FeEDDHA biljka stvara veću lisnu masu, odnosno veće listove koji su bili tamno zeleni i vizualno razvijeniji u odnosu na listove pod tretmanom s FeNaEDTA.
- Buduća istraživanja na ovom sustavu potrebno je usmjeriti u pravcu rješavanja stabilizacije pH vrijednosti i određivanja optimalnog odnosa imerzije i ventilacije TIB sustava te mogućnosti upotrebe nekih drugih hormona u mikropropagaciji paulovnije.
- Kultivacija biljaka putem imerznih bioreaktora izuzetno je prikladna ukoliko nam je potreba brza produkcija svježije biomase.
- Primjena bioreaktora u različite svrhe proizvodnje zahtijevaju daljnju optimizaciju hranjivog medija i preciziranje uvjeta uzgoja pojedinih voćnih vrsta i sorti unutar vrste.
- Uporaba DKW medija uz modifikaciju tj. supstituciju uobičajeno korištenog oblika željeza FeNaEDTA s kelatnim oblikom FeEDDHA vrlo je učinkovita u mikropropagaciji paulovnije kultivara Bellissia.



## 7. POPIS LITERATURE

- Dunlap, J.R. and Robacker, K.M. (1988): Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic acid in tissue culture. *Plant Physiology*, 88, 379–382
- Bahri, B. and Bettaieb, T. (2013): In Vitro Propagation of a Forest Tree *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. - A Valuable Medicinal Tree Species, *Albanian Journal of Agricultural Science*, Vol. 12, No. 1, 2013, pp. 37-42
- Barton, I., Nicholas, I., Ecroyd, C. (2007): *Paulownia*. *For. Res. Bull.* 2007, 231, 5–68
- Becana, M., Moran, J.F. and Iturbe-Ormaetxe, I. (1998): Irondependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil*, 201, 137–147.
- Bergmann, B.A. (1998): Propagation method influences first year field survival and growth of *Paulownia*. *New Forests*, 16: 251–264.
- Bergmann, B.A. and Whetten, R. (1998): In Vitro Rooting and Early Greenhouse Growth of Micropropagated *Paulownia elongata* shoots, *New Forests*, Vol. 15, No. 2, 1998, pp. 127-138. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006591704075>
- Bucheli-Witschel, M., Egli, T. (2001): DAB: Environmental Fate and Microbial Degradation of Aminopolycarboxylic Acids, *FEMS Microbiology Reviews*, 25 (1): 69–106.
- Burger, D.W., Liu, L. and Wu, L. (1985): Rapid Micropropagation of *Paulownia tomentosa*, *HortScience*, Vol. 20, No. 4, 1985, pp. 760-761.
- Campe, O.C., Stape, J.L., Albaugh, T., Lee Allen, H., Fox, T.R., Rubilar, R., Binkley, D. (2013): Fertilization and irrigation effects on tree level aboveground net primary production, light interception and light use efficiency in a loblolly pine plantation. *For. Ecol. Manag.*, 288: 43–48.
- Castillo-Martínez, C.R., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Buenrostro-Nava, M.T., Alcalá, V.M. C. and Iñiguez, J.C. (2012): Regeneration of *Paulownia elongata* Steud. Plants by Direct Organogenesis, *Journal of Forestry*, Vol. 3, No. 10, 2012, pp. 41-49.
- Çelik, Ö.Ç. Atak and Rzakulieva, A. (2008): Stimulation of Rapid Regeneration by a Magnetic Field in *Paulownia* Node Cultures, *Journal of Central European Agriculture*, Vol. 9, No. 2, 2008, pp. 297-304.

- Chakrabarty, D., Dewir, Y.H. Hahn, E.J., Datta, S.K., Paek, K.Y. (2007): The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock 'M9 EMLA' in temporary versus continuous immersion bioreactors. *Plant Growth Regulation*, 51:11--19.
- Corredoira, E., Ballester, A. and Vieitez, A. (2008): Thidiazuron - Induced High-Frequency Plant Regeneration from Leaf Explants of Paulownia tomentosa Mature Trees, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 95, No. 2, 2008, pp. 197-208. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9433-6>
- Donald, D.G.M., Hu, T.W., Cheng, W.E. (1988): A study of the mycorrhizal associations of Paulownia taiwaniana. *S. Afr. J. Plant Soil*, 5 (2):79-83.
- Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. (1984): In Vitro Propagation of Paradox walnut Rootstock, *Hort. Science*, 19(4), August 1984.
- Drvodelić, D. Oršanić, M., Paulić, V. (2016): Utjecaj ektomikorize i huminskih kiselina na morfološke značajke jednogodišnjih sadnica hibrida Paulownia tomentosa x Paulownia fortunei. *Šum. list* 140: 327–337.
- Drvodelić, D. (2018a): Plantažni uzgoj paulovnije. *Gospodarski list (mali gospodarski savjetnik* 15.03.2018.).
- Drvodelić, D. (2018b): Razmnožavanje paulovnije korijenskim reznicama. *Šum. list* 142: 297–307.
- Dujmović, M. (2014): Morfološko-biološke značajke i ispitivanje klijavosti sjemena paulovnije (Paulownia elongata S. Y. Hu.). Završni rad. *Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*, 35 str.
- El-Showk, S. i El-Showk, N. (2003): The Paulownia Tree: An Alternative for Sustainable Forestry, [http://www.cropdevelopment.org/docs/PaulowniaBrochure\\_print.pdf](http://www.cropdevelopment.org/docs/PaulowniaBrochure_print.pdf)
- Fan, G.Q., Zhai, X.Q., Zhai, C.J. and Bi, H.T. (2001): Callus Induction from Leaves of Different Paulownia Species and Its Plantlet Regeneration, *Journal of Forestry Research*, Vol. 12, No. 4, 2001, pp. 209-214. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02856709>
- García-Morote, F.A., López-Serrano, F.R., Martínez-García, E., Andrés-Abellán, M., Dadi, T., Candel, D., Rubio, E., Lucas-Borja, M.E. (2014): Stem Biomass Production of Paulownia elongata × P. fortunei under Low Irrigation in a Semi-Arid Environment. *Forests* 5: 2505–2520.
- Hangarter, R.P. and Stasinopoulous, T.C. (1991): Effect of Fecatalysed photo-oxidation of EDTA on root growth in plant culture media. *Plant Physiology*, 96, 843–847

- Ho, C.K. and Jacobs, G. (1995): Occurrence and Recovery of Vitrification in Tissue Cultures of Paulownia Species, Bulletin of Taiwan Forestry Research Institute, Vol. 10, No. 4, 1995, pp. 391-403.
- Ho, C.K., Chen, Z.Z., Tsai, J.Y. and Yang, J.C. (1997): Nodule Culture of Paulownia x taiwaniana, Taiwan Journal of Forestry Science, Vol. 12, No. 1, 1997, pp. 39-45.
- Ho, C.H. and Chang, S.H. (2002): A Rapid Method to Establish Suspension Cultures of Paulownia Species, Taiwan Journal of Forest Science, Vol. 17, No. 4, 2002, pp. 421- 427.
- Ipekci, Z., Altinkut, A., Kazan, K., Bajrovic, K. and Gozukirmizi, N. (2001): High Frequency Plant Regeneration from Nodal Explants of Paulownia elongata, Plant Biology, Vol. 3, No. 2, 2001, pp. 113-115. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2001-12903>
- Ipekci, Z. and Gozukirmizi, N. (2003): Direct Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed Production from Paulownia elongata, Cell Biology and Morphogenesis, Vol. 22, No. 1, 2003, pp. 16-24
- Ipekci, Z. and Gozukirmizi, N. (2005): Indirect Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf and Internode Explants of Paulownia elongata, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 79, No. 3, 2005, pp. 341-345.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-003-4632-7>
- Jagannathan, L. and Marcotrigiano, M. (1986): Phenotypic and Ploidy Status of Paulownia tomentosa Trees Regenerated from Cultured Hypocotyls, Plant Cell Tissue and Organ Culture, Vol. 7, No. 3, 1986, pp. 227-236.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00037739>
- Joshee, N. (2012): Paulownia, in: C. Kole, C.P. Joshi, D.R. Shonnard (Eds.), Handbook of Bioenergy Crop Plants, CRC Press, New York, USA, pp. 671–686.
- Kozai, T. and Kubota, C. (2001): Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants, Journal of Plant Research, Vol. 114, No. 4, 2001, pp. 525-537. <http://dx.doi.org/10.1007/PL00014020>
- Kumar, P.P., Rao, C.D. and Goh, C.J. (1998): Influence of Petiole and Lamina on Adventitious Shoot Initiation from Leaf Explants of Paulownia fortunei, Plant Cell Reports, Vol. 17, No. 11, 1998, pp. 886-890.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s002990050503>
- Kumarmangalam Yadav, N., Nanda Vaidya, B., Henderson, K., Frost Lee, J., Marshay Stewart, W., Arun Dhekney, S., Joshee, N. (2013): A Review of Paulownia

- Biotechnology: A Short Rotation, Fast Growing Multipurpose Bioenergy Tree. American Journal of Plant Sciences, 2013, 4, 2070-2082  
<http://www.scirp.org/journal/ajps>) <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.411259>
- Lloyd, G. and McCown, B. (1981): Commercially Feasible Micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot Tip Culture,” Proceedings of the International Plant Propagators Society, Vol. 30, 1981, pp. 421- 427.
- Lobna, S.T., Ibrahim, M.M.S. and Farahat, M.M. (2008): A Micropropagation Protocol of *Paulownia kawakamii* through in Vitro Culture Technique, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, Vol. 2, No. 3, 2008, pp. 594-600.
- Madeira, M.V., Fabiao, S., Pereira, J.S., Araújo, M.C., Ribeiro, C. (2002): Changes in carbon stocks in *eucalyptus globulus* Labill. plantations induced by different water and nutrient availability. For. Ecol. Manag., 171: 75–85.
- Marcotrigiano, M. and Stimart, D.P. (1983): In Vitro Organogenesis and Shoot Proliferation of *Paulownia tomentosa* Steud. (Empress Tree), Plant Science Letters, Vol. 31, No. 2-3, 1983, pp. 303-310.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0304-4211\(83\)90069-X](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4211(83)90069-X)
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures,” *Physiologia Plantarum*, Vol. 15, No. 3, 1962, pp. 473-497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nagy, J. (2003): Effect of Irrigation on Maize Yield (*Zea mays* L.). In *Acta Agraria Debreceniensis*; University of Debrecen, Centre for Agricultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, Department of Land Use and Rural Development: Debrecen, Hungary, 1–6 str.
- Ozaslan, M., Can, C. and Aytakin, T. (2005): Effect of Explant Source on In vitro Propagation of *Paulownia tomentosa* Steud, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, Vol. 19, No. 3, 2005, pp. 20-26.
- Persson, J. (2012): Evaluation of a new type of temporary immersion system (TIS) bioreactors for plant micropropagation, Degree Project in the Horticultural Science Program, 2012, Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Landscape Planning and Agricultural Sciences, Department of Plant Breeding and Biotechnology.
- Radojević, L. (1979): Somatic Embryos and Plantlets from Callus Cultures of *Paulownia tomentosa* STEUD.,” *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Vol. 91, No. 1, 1979, pp. 57-62.

- Rout, G.R., Reddy, G.M. and Das, P. (2001): Studies on in Vitro Clonal Propagation of *Paulownia tomentosa* STEUD, and Evaluation of Genetic Fidelity through RAPD Marker,” *SilvaeGenetica*, Vol. 50, No. 5-6, 2001, pp. 208- 212.
- Rao, C.D., Goh, C.J. and Kumar, P.P. (1993): High Frequency Plant Regeneration from Excised Leaves of *Paulownia fortunei*, *In Vitro Cellular & Developmental Biology— Plant*, Vol. 29, No. 2, 1993, pp. 72-76.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02632255>
- Rao, C.D., Goh, C.J. and Kumar, P.P. (1996): High Frequency Adventitious Shoot Regeneration from Excised Leaves of *Paulownia* spp. Cultured in Vitro, *Plant Cell Reports*, Vol. 16, No. 3-4, 1996, pp. 204-209.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF01890868>
- ShaValli Khan, P.S., Kozai, T., Nguyen, Q.T., Kubota, C. and Dhawan, V. (2003): Growth and Water Relations of *Paulownia fortunei* under Photomixotrophic and Photoautotrophic Conditions, *Biologia Plantarum*, Vol. 46, No. 2, 2003, pp. 161-166. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022844720795>
- Shibli, R.A., Smith, M.A.L. and Nasr, R. (1997): Iron source and cytokinin mitigate the incidence of chlorosis and hyperhydration in vitro. *Journal of Plant Nutrition*, 20, 773–781.
- Shibli, R.A., Mohammad, M.J. and Ajlouni, Z.I. (2002): Growth and micronutrient acquisition of in vitro grown bitter almond and sour orange in response to iron concentration from different iron chelates. *Journal of Plant Nutrition*, 25, 1599–1606.
- Song, S.L., Suda, K., Ishii, K., Saito, A. and Ohba, K. (1991): Plantlet Regeneration from Leaf and Petiole Explants of in Vitro Cultured *Paulownia catalpifolia*, *Journal of the Japanese Forestry Society*, Vol. 73, No. 1, 1991, pp. 60- 63.
- Song, S.L., Sato, T., Ishii, K., Saito, A. and Ohba, K. (1990): In Vitro Mass Propagation by Meristem Culture of Two Mature Trees of *Paulownia catalpifolia*, *Journal of the Japanese Forestry Society*, Vol. 72, No. 6, 1990, pp. 495- 498
- 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
- Venkateswarlu, B., Mukhopadhyay, J., Sreenivasan, E. and Kumar, V.M. (2001): Micropropagation of *Paulownia fortunei* through in Vitro Axillary Shoot

Proliferation, Indian Journal of Experimental Biology, Vol. 39, No. 6, 2001, pp. 594-599.

Yang, J.C., Chang, S.H. and Ho, C.K. (1989): Micropropagation of Paulownia taiwaniana from Mature Tissues, Annals of Forest Science, Vol. 46, 1989, pp. 165-167.  
<http://dx.doi.org/10.1051/forest:19890538>

### **Internetski izvori:**

<https://www.agroklub.com/sumarstvo/paulovnija-daje-i-drvni-materijal-i-med-i-stocnu-hranu/34966/>

<https://www.agroklub.com/sumarstvo/ulaganja-i-isplativost-uzgoja-paulovnije/23486/>

<https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/D0246>

## 8. SAŽETAK

Prilikom razmnožavanja paulovnije sjemenom uslijed rekombinacije svojstava, nove biljke nisu identične majčinskoj biljci, a plantaže s takvim sadnicama rezultiraju lošom produkcijom drvene mase. Većina rasadnih centara u RH provodi razmnožavanje paulovnije korijenskim reznicama (vegetativno) ili uvozi sadni materijal. Upotreba suvremene metode, odnosno tehnike mikropropagacije u kulturi tkiva *in vitro* nameće se svojom superiornosti u cilju dobivanja velikog broja ujednačenog, zdravstveno ispravnog i certificiranog sadnog materijala. Ovim diplomskim radom pri Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek na Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) ispitivana je mogućnost optimizacije protokola razmnožavanja paulovnije kultivara *Bellissia (Paulownia elongata F2)* u kulturi tkiva *in vitro*. Uspoređen je konvencionalni modela proizvodnje na polučvrstom hranjivom mediju s imerznim bioreaktorima nove generacije (TIB/TIS sustav). Tretmani su uključivali aplikaciju dva kelatna oblika željeza (FeNaEDTA i FeEDDHA). Automatizacija procesa pomoću suvremenih imerznih bioreaktora (TIB sustav) koji koristi tekući medij uvelike je ubrzala i smanjila troškove izbacivanjem agara u potpunom ciklusu mikropropagacije paulovnije. Utvrđene su značajne razlike između primijenjenih tretmana i modela. Kultivacija biljaka putem imerznih bioreaktora izuzetno je prikladna ukoliko nam je potreba brza produkcija svježe biomase. Uporaba DKW medija uz modifikaciju tj. supstituciju uobičajeno korištenog oblika željeza FeNaEDTA s kelatom u obliku FeEDDHA vrlo je učinkovita u mikropropagaciji paulovnije kultivara *Bellissia*.

**Ključne riječi:** paulovnja, mikropropagacija, FeEDDHA, DKW, bioreaktori

## 9. SUMMARY

Doing propagation of paulownia from seed resulted in the recombination of properties, new plants are not identical to the mother plant, and plantations with these seedlings result in poor timber production. Most of the plant nursery centers in the Republic of Croatia carry out the propagation of paulownia by root cuttings (vegetative) or import planting material. Using the contemporary method, micropropagation technique (plants tissue culture in vitro) imposes itself on its superiority to obtain a large number of uniform, healthy and certified planting material. This graduate thesis at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Department of Pomology, Viticulture and Enology (Pomology Laboratory) examines the possibility of optimizing the propagation protocol of Paulownia cultivar Bellissia (*Paulownia elongata F2*) in tissue culture in vitro. The conventional production model on the semi-solid nutrient medium was compared with the next-generation temporary immersion bioreactor (TIB / TIS system). The treatments included the application of two chelating forms of iron (FeNaEDTA and FeEDDHA). Process automation, using a temporary immersion bioreactor (TIB system), which uses liquid medium has greatly accelerated and reduced costs by removing agar in the complete micropropagation cycle of Paulownia. Significant differences were found between applied treatments and models. Cultivation of plants in temporary immersion bioreactors is extremely suitable if we need the rapid production of fresh biomass. The use of the DKW medium with modification, i.e. substitution of the commonly used FeNaEDTA iron form with FeEDDHA chelate is very effective in micropropagation of Paulownia Bellissia cultivars.

**Key words:** Paulownia, Micropropagation, FeEDDHA, DKW, Bioreactor



## 10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Kronološki pregled istraživanja u <i>in vitro</i> kulturi tkiva paulovnije.....	15
Tablica 2. Sastav korištene hranjive podloge DKW.....	22
Tablica 3. Tretmani u pokusu.....	23
Tablica 4. Statističke razlike na razini pokusa između: tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) i primijenjenog modela <i>in vitro</i> (polučvrsti i tekući TIB) te interakcija tretman x model za promatrane parametre uspješnosti mikropropagacije paulovnije Bellissia (veličina izdanaka, broj nodija, broj listova, širina lista, dužina lista i broj izdanaka).....	25
Tablica 5. Razlike između modela (polučvrsti konvencionalni i tekući TIB) unutar tretmana FeEDDHA na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj nodija, broj lista, širina lista, dužina listova i broj izdanaka) kod palulovnije Bellissia.....	26
Tablica 6. Razlike između modela (polučvrsti i tekući TIB) unutar tretmana FeNaEDTA na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj nodija, broj lista, širina lista, dužina listova i broj izdanaka) kod palulovnije Bellissia .....	26
Tablica 7. Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) unutar polučvrstog konvencionalnog <i>in vitro</i> modela na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj nodija, broj listova, širina lista, dužina lista i broj izdanaka) kod palulovnije Bellissia.....	27
Tablica 8. Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) unutar tekućeg TIB modela na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj nodija, broj listova, širina listova, dužina listova i broj izdanaka) kod palulovnije Bellissia.....	27

## 11. POPIS SLIKA

Slika 1. Paulovnja.....	3
Slika 2. Paulovnja tomentosa.....	4
Slika 3. Drvna sirovina paulovnije.....	5
Slika 4. Izrada glazbenog instrumenta od paulovnije.....	6
Slika 5. Plantaža paulovnije.....	7
Slika 6. Morfološke karakteristike paulovnije.....	8
Slika 7. Korijen trogodišnje paulovnije.....	9
Slika 8. Hibridi paulovnije 9501 i Shan Tong .....	10
Slika 9. Korijenske reznice paulovnije prije i nakon rizogeneze, shema razmnožavanja korijenskim reznicama.....	12
Slika 10. Faze razmnožavanja paulovnije kulturom tkiva in vitro.....	13
Slika 11. Suvremeni imerzni sustav bioreaktora TIB/TIS, Laboratorij za voćarstvo – FAZOS.....	19
Slika 12. Kultivar u istraživanju – <i>in vitro</i> paulovnja Bellissia / Paulownia elongata F2...21	
Slika 13. Eksplantati na polukrutom mediju u teglici (A) i (B) tekućem mediju u bioreaktoru.....	22
Slika 14. Mjerenja u istraživanju.....	23
Slika 15. Biljke na tretmanu FeEDDHA.....	29
Slika 16. Biljke na tretmanu FeNaEDTA.....	29
Slika 17. Biljka na polučvrstom mediju.....	30
Slika 18. Biljka na tekućem mediju TIB.....	30

Slika 19. Tretman FeEDDHA – A polučvrsti medij, B tekući medij.....	31
Slika 20. Tretman FeNaEDTA – A (polučvrsti medij) i B (tekući medij).....	32
Slika 21. Tretmani s biljkama na polučvrstom mediju – A (FeNaEDTA) i B (FeEDDHA).....	33
Slika 22. Tretmani s biljkama na tekućem mediju – A (FeNaEDTA) i B (FeEDDHA).....	33
Slika 23. pH tekućeg medija po tretmanima na kraju ciklusa – 30 dan.....	34

## 12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Razlike između primijenjenih tretmana FeNaEDTA i FeEDDHA.....	28
Grafikon 2. Razlike između primijenjenih modela – polučvrsti i tekući medij.....	29
Grafikon 3. Razlike između sustava za tretman FeEDDHA.....	30
Grafikon 4. Razlike između sustava za tretman FeNaEDTA.....	31
Grafikon 5. Razlike između Fe tretmana unutar polučvrstog modela.....	32
Grafikon 6. Razlike između Fe tretmana unutar tekućeg TIB modela.....	33
Grafikon 7. Dinamika kretanja pH vrijednosti na tekućem mediju.....	34

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

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

Diplomski rad

## MIKROPROPAGACIJA PAULOVNIJE (*Paulownia spp.*) U TEKUĆEM IMERZNOM SUSTAVU

Marin Marić

**Sažetak:** Prilikom razmnožavanja paulovnije sjemenom uslijed rekombinacije svojstava, nove biljke nisu identične majčinskoj biljci, a plantaže s takvim sadnicama rezultiraju lošom produkcijom drvene mase. Većina rasadnih centara u RH provodi razmnožavanje paulovnije korijenskim reznicama (vegetativno) ili uvozi sadni materijal. Upotreba suvremene metode, odnosno tehnike mikropropagacije u kulturi tkiva in vitro nameće se svojom superiornosti u cilju dobivanja velikog broja ujednačenog, zdravstveno ispravnog i certificiranog sadnog materijala. Ovim diplomskim radom pri Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek na Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) ispitivana je mogućnost optimizacije protokola razmnožavanja paulovnije kultivara Bellissia (*Paulownia elongata F2*) u kulturi tkiva in vitro. Uspoređen je konvencionalni modela proizvodnje na polučvrstom hranjivom mediju s imerznim bioreaktorima nove generacije (TIB/TIS sustav). Tretmani su uključivali aplikaciju dva kelatna oblika željeza (FeNaEDTA i FeEDDHA). Automatizacija procesa pomoću suvremenih imerznih bioreaktora (TIB sustav) koji koristi tekući medij uvelike je ubrzala i smanjila troškove izbacivanjem agara u potpunom ciklusu mikropropagacije paulovnije. Utvrđene su značajne razlike između primijenjenih tretmana i modela. Kultivacija biljaka putem imerznih bioreaktora izuzetno je prikladna ukoliko nam je potreba brza produkcija svježe biomase. Uporaba DKW medija uz modifikaciju tj. supstituciju uobičajeno korištenog oblika željeza FeNaEDTA s kelatom u obliku FeEDDHA vrlo je učinkovita u mikropropagaciji paulovnije kultivara Bellissia.

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

**Mentor:** prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević

**Broj stranica:** 53

**Broj grafikona i slika:** 30

**Broj tablica:** 8

**Broj literaturnih navoda:** 54

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** paulovnija, mikropropagacija, FeEDDHA, DKW, bioreaktori

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. doc.dr.sc. Monika Marković, predsjednik
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Miro Stošić, 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 thesis**

## **MICROPROPAGATION OF PAULOWNIA (*Paulownia spp.*) IN LIQUID IMMERSION SYSTEM**

Marin Marić

**Abstract:** Doing propagation of paulownia from seed resulted in the recombination of properties, new plants are not identical to the mother plant, and plantations with these seedlings result in poor timber production. Most of the plant nursery centers in the Republic of Croatia carry out the propagation of paulownia by root cuttings (vegetative) or import planting material. Using the contemporary method, micropropagation technique (plants tissue culture *in vitro*) imposes itself on its superiority to obtain a large number of uniform, healthy and certified planting material. This graduate thesis at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Department of Pomology, Viticulture and Enology (Pomology Laboratory) examines the possibility of optimizing the propagation protocol of Paulownia cultivar Bellissia (*Paulownia elongata F2*) in tissue culture *in vitro*. The conventional production model on the semi-solid nutrient medium was compared with the next-generation temporary immersion bioreactor (TIB / TIS system). The treatments included the application of two chelating forms of iron (FeNaEDTA and FeEDDHA). Process automation, using a temporary immersion bioreactor (TIB system), which uses liquid medium has greatly accelerated and reduced costs by removing agar in the complete micropropagation cycle of Paulownia. Significant differences were found between applied treatments and models. Cultivation of plants in temporary immersion bioreactors is extremely suitable if we need the rapid production of fresh biomass. The use of the DKW medium with modification, i.e. substitution of the commonly used FeNaEDTA iron form with FeEDDHA chelate is very effective in micropropagation of Paulownia Bellissia cultivars.

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

**Mentor:** full prof. Aleksandar Stanisavljević

**Number of pages:** 53

**Number of figures and pictures:** 30

**Number of tables:** 8

**Number of references:** 54

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** Paulownia, Micropropagation, FeEDDHA, DKW, Bioreactor

**Reviewers:**

1. Monika Marković, asst.prof., president
2. Aleksandar Stanisavljević, full. prof., mentor
3. Miro Stošić, assoc.prof., member

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