

# Dobivanje presadnica nevena (*Calendula officinalis* L.) in vitro metodom

---

**Valenčak, Marta**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*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:151:189621>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-04**



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

Marta Valenčak

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

**Dobivanje presadnica nevena (*Calendula officinalis* L.) *in vitro*  
metodom**

Završni rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marta Valenčak

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

**Dobivanje presadnica nevena (*Calendula officinalis* L.) *in vitro*  
metodom**

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. Prof.dr.sc. Monika Tkalec Kojić, mentor
2. Izv.prof.dr.sc. Tomislav Vinković
3. Boris Ravnjak, mag. ing. agr.

Osijek, 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

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

Završni rad

Marta Valenčak

### Dobivanje presadnica nevena (*Calendula officinalis* L.) *in vitro* metodom

**Sažetak:** Cilj istraživanja bio je ispitati i utvrditi utjecaj različitih metoda sterilizacije sjemenki zbog određivanja najučinkovitijih postupaka za dobivanje sadnica *Calendula officinalis in vitro* metodom klijanja sjemenki na hranjivoj podlozi. U istraživanju je ispitano djelovanje etanola i varikine u različitim koncentracijama i vremenskim intervalima na dezinfekciju sjemenki nevena. Za pokus korišteno je komercijalno sjeme *Calendula officinalis* iz Njemačke kupljeno u trgovačkom centru. Pokus se sastojao od 8 tretmana i kontrolnog tretmana. Svaki tretman bio je zastupljen s 5 Erlenmeyer tikvica s hranjivom podlogom na koju se uvodilo po 5 sjemenki. Utjecaj različitih tretmana nije se ispostavio učinkovitim jer se kontaminiralo 44 od 45 hranjivih podloga. Najveća zabilježena kontaminacija bila je na kontrolnom tretmanu (sjemenke koje su bile samo u vodi 30 minuta), gdje su sve hranjive podloge bile kontaminirane i s bakterijom i gljivicom. Hranjiva podloga koja se nije kontaminirala sadržavala je sjemenke koje su bile držane 30 minuta u otopini varikine u koncentraciji od 10 %.

**Ključne riječi:** sterilizacija, hranjiva podloga, sjemenke, varikina, metoda

32 stranice, 18 slika 38 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 Agricultural Biotechnology Sciences Osijek  
Undergraduate University Study Agriculture, course Hortikultura

BSc Thesis

### Establishment of calendula (*Calendula officinalis* L.) transplants *in vitro*

**Summary:** The goal of the research was to examine and determine the impact of different methods of seed sterilization in order to determine the most effective procedures for obtaining *Calendula officinalis* seedlings *in vitro* by the method of seed germination on a nutrient medium. In the research, the effect of ethanol and bleach in different concentrations and time intervals on the disinfection of marigold seeds was examined. Commercial *Calendula officinalis* seeds from Germany bought in a shopping center were used for the experiment. The experiment consisted of 8 treatments and a control treatment. Each treatment was represented by 5 Erlenmeyer flasks with a nutrient medium to which 5 seeds were introduced. The influence of different treatments did not turn out to be effective because 44 out of 45 nutrient media were contaminated. The highest recorded contamination was in the control treatment (seeds that were only in water for 30 minutes), where all nutrient media were contaminated with both bacteria and fungus. The nutrient medium that did not become contaminated contained seeds that were kept for 30 minutes in a 10 % bleach solution.

**Keywords:** sterilization, nutrient medium, seeds, bleach, method

32 pages, 18 figures, 38 references

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

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. <i>Calendula officinalis</i> L. ....	1
1.1.1. <i>Morfologija</i> .....	2
1.1.2. <i>Biološke značajke i uzgoj</i> .....	4
1.2. Ljekovita svojstva nevena.....	5
1.3. <i>In vitro</i> uzgoj.....	8
1.4. Cilj istraživanja .....	14
2. MATERIJAL I METODE .....	15
2.1 Priprema za pokus .....	16
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
3.1. Učinak različitih tretmana na kontaminaciju .....	20
4. ZAKLJUČAK.....	28
5. POPIS LITERATURE.....	29

## 1. UVOD

Cvjetne vrste su podijeljene u nekoliko skupina, ovisno o mjestu uzgoja, načinu ishrane i dužini životnog vijeka, a to su jednogodišnje, dvogodišnje, trajnice, lončanice, lukovičasto te rizomno i gomoljasto cvijeće. Jednogodišnje cvijeće traje samo jednu godinu, od proljeća do jeseni. Uzgajaju se u rano proljeće iz sjemena, u istoj godini stvaraju korijen, nadzemni dio, izboje s listovima, cvjetove i plodove. Nazivaju se još i ljetnicama, jer se njihova cvatnja odvija tijekom ljeta. Cvatu od svibnja do studenog, to jest do pojave prvih mrazeva te su zbog toga omiljene za sadnju u vrtove i u cvjetne posude. Mnoge se koriste kao rezani cvijet, za vazu (Parađiković, 2014.).

*Calendula officinalis* L. pretežito je jednogodišnja zeljasta biljka, rjeđe dvogodišnja. Tijekom jeseni iznikle biljke mogu prezimiti i u rano proljeće početi rasti (Šilješ i sur., 1992.).

### 1.1. *Calendula officinalis* L.

*Calendula officinalis* L. je vrsta koja pripada porodici glavočika odnosno *Asteraceae*, narodnog imena žutelj, ognjac, zimorod. U porodicu glavočika pretežito pripadaju grmovi i trajnice. Neven (*Calendula*) je biljni rod koji sadrži desetak vrsta, od kojih su u Hrvatskoj uobičajeni ljekoviti (*Calendula officinalis*) i poljski neven (*Calendula arvensis*). Neven kao ukrasna biljka je u Europi poznata od 12. stoljeća, a njegova ljekovita svojstva tada su bila manje poznata. Danas se suhi cvijet sve više upotrebljava kao sastojak masti za liječenje upala sluznice i obnavljanja epitelnih stanica, za izradu boja za prehrambenu industriju te kao antiseptik (Šilješ i sur., 1992.).

Neven je porijeklom iz mediteranskoga područja, a uzgaja se u područjima umjerene klime širom Europe i u Sjevernoj Americi, a danas je rasprostranjen diljem svijeta te mu najviše odgovara rasti na sunčanim gredicama. Može se sijati od proljeća vani na otvorenom, dalje se sam zasijava. Cvate neprekidno cijelo ljeto, pa čak i nakon prvih mrazeva ako zima bude blaga može i prezimiti na otvorenom (Kolar-Fodor, 2010.).

### 1.1.1. Morfologija

Neven ima vretenasti korijen koji raste duboko u tlo. Iz korijena rastu lako lomljive, zeljaste stabljike visoke 50-80 cm. Stabljike su u gornjoj polovici svijetlozelene, razgranate, kao i duguljasti, dlakavi, sjedeći listovi. Na vrhu svake stabljike oblikuje se cvjetna glavica promjera 5-10 cm (slika 1.). U središtu cvjetne glavice se nalaze cjevasti, plodni cvjetovi, a uz rub, u 2-3 reda, jezičasti neplodni, žuti do narančasti cvjetovi. Selekcije se provode radi dobivanja vrste sa što više jezičastih cvjetova, takozvanih latica. Plod je srpasto savijen, svijetlosmeđe do tamnosmeđe boje, nazubljenog vanjskog ruba. Sjemenka je roška, duga od 0,5 do 2 cm (slika 2.). Masa je 1000 sjemenki 4-10 g (Šilješ i sur., 1992.).

Cvijet sadrži karotinoide (3 %), flavnoide, eterično ulje (0,02 %), masno ulje, tanini, triterpeni, polisaharidi, vitamin C (Šilješ i sur., 2007.).

Sjemenka je klijava pet do šest godina, a posijano sjeme niče za četiri do pet dana. Biljka raste brzo, već 40 dana nakon nicanja procvatu prvi cvjetovi, a cvjeta sve do jačih jesenskih mrazova. Tijekom visokih temperatura u srpnju naglo procvjeta i daje sjeme, ali s prvim kišama biljka se obnavlja. Redovitom berbom biljke nevena se pomlađuju i produžuje se vijek vegetacije (Šilješ i sur., 1992.).



Slika 1. *Calendula officinalis* L.

Izvor: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Calendula\\_officinalis3.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Calendula_officinalis3.jpg)



Slika 2. sjeme nevena

Izvor: <https://fineartamerica.com/featured/calendula-officinalis-seeds-scimat.html>

Neven ima gust sustav vlaknastih korijena (slika 3.) te kada je na otvorenom pomaže mu zadržavati vodu u gornjem sloju tla (Hall, 2021.).



Slika 3. Sustav korijena kod nevena

Izvor: [https://www.exeley.com/journal\\_of\\_nematology/doi/10.21307/jofnem-2021-041](https://www.exeley.com/journal_of_nematology/doi/10.21307/jofnem-2021-041)

Sistematika *Calendula officinalis* L.:

- Carstvo: *Plantae*
- Divizija: *Magnoliophyta*



- Razred: *Magnoliopsida*
- Red: *Asterales*
- Porodica: *Asteraceae*
- Tribus: *Calenduleae*
- Rod: *Calendula*

### 1.1.2. Biološke značajke i uzgoj

Neven nije osjetljiv na sušu, voli toplu klimu, a prave prinose daje na rastresitim tlima bogatim humusom (černozemi, smeđa tla i crnice). Veći prinosi postižu se zimskim dubokim oranjem. Na isto tlo može se posijati nakon dvije godine (Šilješ i sur., 1992.).

Dodavanje dušika negativno utječe na prinos cvijeta nevena, a kalij i fosfor poboljšavaju prinos i kakvoću cvijeta. Srednje opskrbljenim tlima nije potrebna prihrana, već samo jesenska osnovna gnojidba, kojom po hektaru treba osigurati 40-50 kg dušika, 60-80 kg fosfora, i 80 kg kalija. Prihrana dušika provodi se u samo iznimnim situacijama, ako to zahtijeva stanje usijeva. Poslije obaveznoga zimskog oranja, tlo se u proljeće usitni i poravna te osigura zbijena posteljica, radi postizanja sigurnog i jednoličnog nicanja usjeva (Šilješ i sur., 1992.).

Kako bi se osigurao što veći prinos cvijeta po jedinici površine, berbu je potrebno započeti što prije. Mlade biljke nevena nisu osjetljive na proljetne mrazove, pa se sjetva može započeti u rano proljeće, tijekom ožujka. Sije se izravno, pomoću strojeva za sjetvu pšenice, na međuredni razmak 50 cm, u neprekidnom nizu, na dubinu od 3 do 4 cm. Za 1 ha dovoljno je od 5 do 6 kg sjemena. Iz rasada neven se može uzgajati jedino ako se uzgaja kao ukrasna biljka (Šilješ i sur., 1992.).

Zaštita od korova započinje zajedno sa sjetvom. U slučaju pojave uskolisnih korova potrebna je naknadna zaštita. Kada se pojavi 3-5 pravih listova, gust usijev potrebno je prorediti na razmak 6-8 cm. Ovisno o karakteristikama tla i zakorovljenosti širokolisnim korovima, obavezno je obaviti dvije do tri kultivacije (Šilješ i sur., 1992.).

Berba cvjetova počinje tijekom svibnja i obavlja se ručno. Ubrane cvjetove treba odmah postaviti na sušenje. Ekonomičnije i brže je sušenje samo latica (jezičastih cvjetova). Osušena

droga je higroskopna, pa je odmah nakon sušenja treba pohraniti u natron-vrećice i skladištiti u suhoj prostoriji. Mogući prinosi su 0,8-1 t osušenih glavica ili 0,4-0,5 t latica po hektaru (Šilješ i sur., 1992.).

## **1.2. Ljekovita svojstva nevena**

Za vrijeme cvatnje koriste se listovi i cvjetne glavice. Primjenjuju se kod raznih upalnih stanja kože, nadražene sluznice i liječenje rana. Antiupalna svojstva pomažu kod tretmana gastritičnih čireva i za probavni sustav (Gligić, 1953.). Dobar je u borbi protiv problema s jetrom, bubrežima i urinarnim traktom te se koristi u liječenju herpesa. Čaj je jako dobar za liječenje virusne i bakterijske urinoinfekcije, a oblozi i kreme ublažavaju opekline, otekline i bol te su odlična pomoć prilikom uganuća te uboda pčela ili osa. Krema od nevena se često koristi u liječenju ispucanih usana, modrica i proširenih vena, kao i za liječenje hemeroida (Horvat).

Najpoznatija nevenova primjena je u izradi kućnih pripravaka za njegu kože. Nevenov uljni macerat najpoznatije je sredstvo koje se upotrebljava za razna oštećenja i upalne bolesti kože. Priprema uljnog macerata: u željenu staklenku stave se cvjetovi te preliju biljnim uljem (ulja suncokreta, marelice, maslinovo ulje...). Nakon što je odstojalo od tri do četiri tjedna, ulje je potrebno filtrirati i uliti u tamne staklene boce. Drži se na tamnom i hladnom mjestu. Listovi i cvjetovi su jestivi, a listovi obiluju vitaminima i mineralima te se mogu jesti sirovi (Gligić, 1953.).

Neven sadrži antibakterijska, antivirusna, antifungalna i imuno stimulirajuća svojstva te se razni pripravci od nevena koriste za vanjsku, ali i unutarnju primjenu. Čaj djeluje i kao diuretik te sredstvo za znojenje. Pomaže pri liječenju čireva u ustima i želucu. Nevenovi pripravci za vanjsku upotrebu dobri su i protiv bradavica, akni, ekcema, ozeblina i opekline te pomažu zacijeljivanju rana. Stimuliraju rast granulacijskog tkiva čime se potiče nastanak novih stanica. Prirodne kemijske tvari koje sadrži nevenov cvijet ujedno su i aktivni sastojci, triterpenski saponini, triterpenski alkoholi i flavonoidi tvari koje pospješuju rast novog tkiva. Tinktura od nevena dobra je kod ozlijeda mišića, oteklina, podljeva i nagnječenja. Kod vanjske primjene pojačani učinak postiže se kombinacijom pripravaka od nevena s timijanom, mirhom ili uljem čajnog drva (<https://elbi-medikal.hr/ljekoviti-neven/>).

„Od svih vrsta unutar roda *Calendula*, jedino se *C. officinalis* koristi u cijelom svijetu i baš je ona navedena u Njemačkoj Komisiji E (German Commission E), Europskoj znanstvenoj zadruzi za fitoterapiju (European Scientific Co-operative on Phytotherapy), Britanskoj biljnoj farmakopeji (British Herbal Pharmacopoeia) i monografiji Svjetske zdravstvene organizacije za zacjeljivanje rana i protuupalna djelovanja (World Health Organization monographs for wound healing and anti-inflammatory actions)." (<https://elbi-medikal.hr/ljekoviti-neven/>).

Kod pojedinih osoba koji su osjetljivi na druge vrste biljaka iz porodice *Asteraceae* neven može uzrokovati alergijsku reakciju. Zbog abortativnog (emenagognog), spermicidnog i antiblastocitnog djelovanja ne preporučuje se konzumacija nevena u trudnoći (<https://www.naturala.hr/calendula-officinalis-ljekovito-bilje-531/>).

Neven se može primjenjivati i u ekološkoj proizvodnji povrća jer svojim mirisom reducira prisustvo štetnih kukaca i tako štiti usjev od štetnika. Od listova i cvjetova nevena može se praviti veliki broj zaštitnih sredstava. Sijanje se obavlja između redova uzgajanih biljaka radi zaštite od nematoda, grinja, leptira kupusara, uši i tripsa. Zaoravanjem nevena u cvatu služi kao odlično sredstvo protiv zemljišnih štetnika (Plavšić, 2017.).

U Indiji, biljni spojevi uključujući neven koriste se lokalno za liječenje hemoroida. Krema od nevena sama ili u kombinaciji s drugim lijekovima omiljeni su homeopatski lijek za liječenje abrazija i manjih opekline. Suhe latice nevena koriste se u trgovini začinima kao jeftina alternativa šafranu i koriste se u mnogim mastima za poboljšavanje izgleda dodavanjem nevenove zlatne boje. Cvjetovi se koriste u melemima za liječenje rana, herpesa, čireva, ozeblina, oštećenja kože, ožiljaka i pročišćivanja krvi, a listovi se u infuziji koriste za liječenje proširenih vena (Khalid i Teixeira da Silva, 2011.).

U Europi listov nevena se smatraju sredstvom za razrjeđivanje i dijaforetikom, a cvjetovi se koriste kao stimulans, antispazmodik i emenagog. U Velikoj Britaniji uvarak od cvjetova se koristi kao jak napitak za liječenje ospica i velikih boginja, a svježi sok kao lijek protiv žutice, zatvora i suzbijanja menstrualnih protoka (Khalid i Teixeira da Silva, 2011.).

Korisnost *C. Officinalis* zabilježeno je u obliku dekocija, infuzija i tinktura u tradicionalnim sustavima lijekova za liječenje kožnih bolesti poput psorijaze, lepre i tako dalje. *C. officinalis* može se široko primjenjivati kao antiseptik, protuupalno i cikatrizirajuće (pomaže zarastanju

rana) sredstvo, kao i lagano antibakterijsko i antivirusno sredstvo. Mnoge vrste nevena imaju karakterističan miris ili okus uzrokovan mono- i seskviterpenima unutar hlapivog ulja (VO), što je u mnogim slučajevima razlog njihove primjene u narodnoj medicini (Khalid i Teixeira da Silva, 2011.).

Niz fitokemijskih studija pokazalo je prisutnost nekoliko klasa kemijskih spojeva, glavni su VO karotenoidi, flavonoidi, terpenoidi, kumarini, kinini, aminokiseline, ugljikohidrati, lipidi i druge sastavnice (Khalid i Teixeira da Silva, 2011.).

Flavoksantin, luteoksantin, likopen, auroksantin, lutein, karoten i fenolni spojevi glavni su karotenoidi prisutni u ovom cvijetu. Ovi spojevi su hvatači slobodnih radikala i poboljšaju zacjeljivanje rana stvaranjem umjetnog križa poveznica (Khalid i Teixeira da Silva, 2011.).

*C. officinalis* nakuplja velike količine karotenoida u svojim cvatovima. Žuto-narančasta boja cvatova uglavnom je posljedica karotenoida, a nijansa ovisi o sadržaju i profilu pigmenata. Karotenoidi se razlikuju od antocijana i betalainsa po tome što igraju bitnu ulogu u životu biljaka, na primjer fotozaštitne funkcije tijekom fotosinteze i pružanje supstrata za biosintezu regulatora rasta biljaka, apscizinska kiselina te možda i drugi fitohormoni. Karotenoidi također igraju važnu ulogu u ljudskom tijelu, prehranom i zdravljem, osiguravajući provitamin A i imajući aktivnosti protiv raka. Neki karotenoidi se koriste kao bojila za hranu, kozmetiku ili lijekove (Khalid i Teixeira da Silva, 2011.).

Ekstrakti propilen glikola latica i cvjetnih glavica, ispitana antioksidacijska aktivnost od strane peroksidacije lipida, pokazuju da je ekstrakt latica bio moćniji od ekstrakta cvjetne glavice, na temelju analize malondialdehid u plazmi i urinu. Ekstrakt *C. officinalis* pokazao je anti-ROS i anti-RNS djelovanje na način ovisan o koncentraciji, pri čemu se značajni učinci opažaju čak i pri vrlo niskim koncentracijama: 0,20 µg/ml bez L-arginina, 0,10 µg/ml s L-argininom je dodan testu s forbol 12-miristat 13-acetatom i 0,05 µg/ml kada je dodan u test s N-formil-metionil-leucil-fenilalaninom. Drugo istraživanje potvrdilo je ove nalaze: 0,20 µg/ml, što je najniža koncentracija ekstrakta *C. officinalis*, značajno smanjena 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil. Ova otkrića su zanimljiva za poboljšanje antioksidativne mreže i obnavljanja redoks ravnoteže u ljudskim stanicama s molekulama biljnog podrijetla kao i povećanje mogućnosti antagonizirajućeg oksidativnog stresa koji nastaje u živim organizmima kada je ravnoteža u

korist slobodnih radikala, kao rezultat iscrpljivanja staničnih antioksidansa. Fitokemijski sastojci *C. officinalis* uključuju flavonoide poput lupeola, kvercetina, protokatehuinske kiseline, itd., mnogi alkaloidi i triterpenoidi (Khalid i Teixeira da Silva, 2011.).

Etanolni ekstrakt cvjetova biljke ispitivan je protiv eksperimentalno izazvanih toplinskih opekline kod štakora. Među različitim dozama ekstrakta (20, 100 i 200 mg/kg tjelesne težine), doza od 200 mg/kg pokazala je značajno poboljšanje u zacjeljivanju rana kao što je naznačeno povećanjem sadržaja kolagenhidroksiprolina i heksozamina. Razina proteina akutne faze (heptaglobin, orosomicid) i enzima markera oštećenja tkiva (alkalna fosfataza, alanin i aspartat transaminaza) značajno se smanjila. Smanjenje peroksidacije lipida moglo bi biti posljedica njegovog antioksidativnog svojstva. Svakodnevna primjena 2 % gela nevena rezultirala je boljim zacjeljivanjem rana zbog njegovih antimikrobnih i antioksidativnih svojstava (Khalid i Teixeira da Silva, 2011.).

### **1.3. *In vitro* uzgoj**

Ispitivanje koje se provodi *in vitro* (u staklu) metodom predstavlja ispitivanje izvan živog organizma i uglavnom uključuje izolirana tkiva, organe ili stanice. Jedan od mogućih načina korištenja *in vitro* uzgoja je metoda umnožavanja ili mikrorazmnožavanja (kultura meristema). Mikrorazmnožavanje je najraširenija metoda korištenja *in vitro* uzgoja. To je metoda vegetativne propagacije s ciljem dobivanja zdravih presadnica, odnosno bezvirusnog sadnog materijala s kojim se dobivaju genetski identične biljke. Ova se metoda koristi u strogo kontroliranim uvjetima iz malih komadića tkiva izrezanih iz roditeljske biljke (eksplantati) ili čak i iz zasebnih stanica pa i protoplasta moguće je regenerirati čitvau biljku (<http://www.biotech.hr/djelatnosti/proizvodnja/>).

Ideja da se uzgajaju i izdvajaju organi, tkiva i stanice biljaka u kontroliranim laboratorijskim uvjetima datira još iz 19.st. kao rezultat teorije o totipotentnosti stanica Schwann (1847.). prve praktične pokušaje dobivanja *in vitro* kultura napravio je Haberlandt (1902.). Dobivanje pravih kultura tkiva, odnosno kalusa, uslijedilo je 1939. kada su Gautheret (1939.) i Nobecourt (1939.) objavili uspješno kultiviranje i dobivanje kalusa mrkve. U slijedećim radovima dokazano je da se kalus može i diferencirati, odnosno da je moguće regenerirati biljne organe.

Precizniji uvjeti pod kojima dolazi do diferenciranja organa definirani su tek kasnije otkrićem citokinina – regulatora rasta koji stimuliraju diobu stanica. U radu s biljnim *in vitro* kulturama prekretnica se dogodila kada su Skoog i Miller (1957.) utvrdili da se odnosom citokinina i auksina može regulirati organogeneza (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996.).

Postupak mikropropagacije razrađen je u prvoj polovini 70-ih godina prošloga stoljeća na voćnim vrstama, a posebno na jagodama i podlogama za razne vrste roda *Prunus*. Pojava mikropropagacije bila je trijumf primjene metoda kulture *in vitro* u klonskom razmnožavanju biljaka. Mikropropagacija je omogućila izuzetno veliku brzinu razmnožavanja, tijekom cijele godine, u laboratorijskim uvjetima gdje je moguće osigurati potpunu kontrolu uvjeta rasta i zdravstvenog stanja kulture (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996.).

Eksplantati se uzgajaju na tekućim ili krutim hranjivim podlogama koje sadržavaju organske dodatke (vitamine, aminokiseline, ugljikohidrate, šećere i biljne hormone) i mineralne soli. Danas je ta metoda postala značajna kod oplemenjivanja poljoprivrednih, drvenastih i hortikulturnih biljaka. Ona pruža dobivanje biljaka oslobođenih od patogenih klica, posebice virusa, a služi i za dobivanje određenih sekundarnih biljnih produkata. Razmnožavanjem meristemskog tkiva na hranjivoj, hormonskoj podlozi može se dobiti mnogo veći broj biljaka nego što bi se moglo dobiti dijeljenjem biljke. Nedostatak ovog razmnožavanja je to što se dobivaju identične biljke koje se teško razmnožavaju ili su sklone bolestima (<http://www.biotech.hr/djelatnosti/proizvodnja/>).

Mikrorazmnožavanje mnogih biljnih vrsta danas ima prednost u odnosu na klasično vegetativno razmnožavanje i to zbog ovih činjenica:

1. Razmnožavanje *in vitro* (u staklu) je puno brže od *in vivo* (unutar živog) razmnožavanja.
2. Razmnožavanje *in vitro* pruža ukorijenjivanje reznica pa je cijepljenje pupova na podloge nepotrebno čime se štedi izbjegavanje problema inkompatibilnosti i vrijeme. To je jako važno za vrste kao što su rododendron, jorgovan ili ruže.
3. Mogu se razmnožavati i one biljne vrste koje se ne mogu razmnožavati u *in vivo* uvjetima.

4. Razmnožavanjem *in vitro* mogu se uštedjeti razna sredstva koja se inače troše za grijanje staklenika, prostora i tako dalje.
5. Zbog optimalnih uvjeta olakšano je precizno vremensko planiranje proizvodnje presadnica, čime se isključuje sezonski utjecaj i ostvaruje proizvodnja kroz cijelu godinu.
6. Mikroklonirane biljke obično rastu snažnije i bolje od biljaka kloniranih *in vivo*.
7. U metodi *in vitro* razmnožavaju se samo zdrave biljke.
8. Nove sorte omogućuju brzo komercijalno razmnožavanje i tako se u mnogo kraćem vremenu mogu ponuditi tržištu.
9. Brže mogu postati mali roditeljski klonovi za stvaranje F1 hibrida.

Nedostaci kod *in vitro* razmnožavanja:

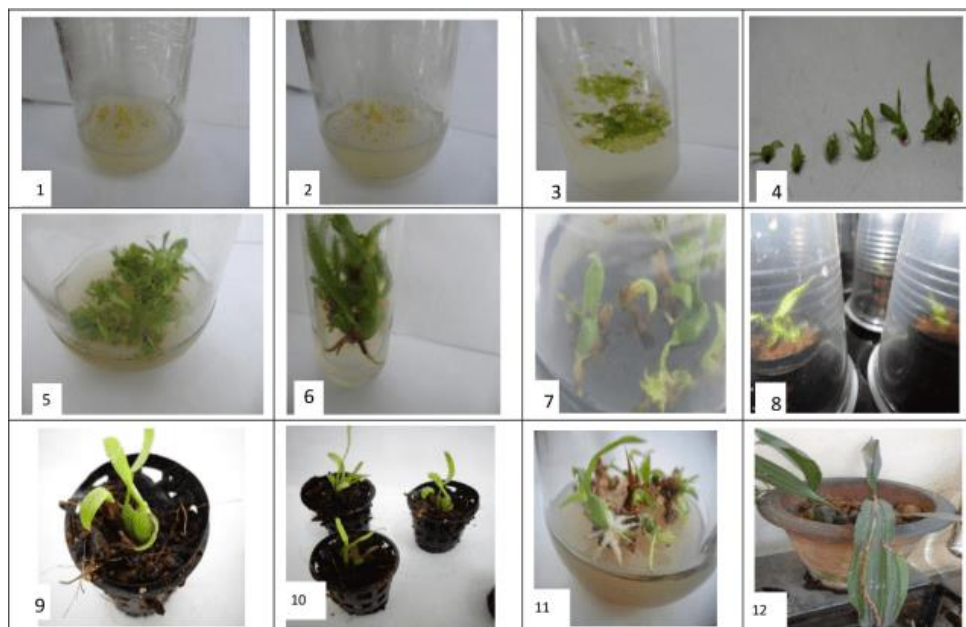
1. Biljke kod prijenosa iz uvjeta *in vitro* u uvjete *in vivo* kod nekih vrsta je posebice zahtjevan i težak.
2. Kod drvenastih vrsta jako je teško potaknuti ukorijenjivanje reznica *in vitro*.
3. Biljke koje su se razmnožavale *in vitro* te će se na kraju uzgajati u polju na otvorenom mogu biti vrlo osjetljive na bolesti i patogene organizme.
4. Sposobnost regeneriranja se može izgubiti nakon određenog broja supkultura kalusnog tkiva ili stanica.
5. Uzgojem *in vitro* razina ugljičnog dioksida i etilena se može povisiti na neprihvatljivu razinu što rezultira biljkama loše kvalitete.
6. Tijekom prijenosa biljaka iz epruvete u tlo, dolazi do gubitka velikog broja biljaka zbog aklimatizacije.

Presadnice u uvjetima *in vitro* metodom mogu se ostvariti na tri načina:

1. Poticanjem rasta aksilarnih pupova,
2. Somatskom embriogenezom i
3. Stvaranjem adventivnih izdanaka

Metode s kojima se kloniraju biljke u *in vitro* su: individualni nodijski segmenti (reznice), regeneracija adventivnih organa (korijena i izdanka) na eksplantatima i aksijalno grananje (<http://www.biotech.hr/djelatnosti/proizvodnja/>).

*In vitro* metodom iz sjemena najčešće se razmnožavaju biljne vrste koje proizvode jako malo sjemena, čije sjeme ima slabu klijavost (slika 4.) ili se teško vegetativno razmnožavaju (Brozinčević, 2022.).



Slika 4. Primjer klijanja sjemena orhideje *in vitro*

Izvor: <https://mraclin.hr/druga-strana-loncica/>

*In vitro* kultura biljaka, koja obuhvaća stanice, tkiva, kulturu organa, također i embrija, bila je vitalna tehnika za masovno razmnožavanje biljaka. Uklanjanje biljnih bolesti temeljitom tehnikom kulture meristematskog tkiva, očuvanje biljaka i poboljšanje usjeva putem prijenosa gena (Singh i Chand 2003.). Kontaminacija kultura biljnih tkiva različitim mikroorganizmima, poput bakterija i gljivica, smanjuje njihovu produktivnost i može potpuno onemogućiti njihov uzgoj. Stoga uspješni protokoli kulture tkiva počinju učinkovitom sterilizacijom eksplantata (Dodds i Roberts 1985.). Za uklanjanje gljivičnih i bakterijskih kontaminacija se koristilo nekoliko različitih metoda, uključujući upotrebu antibiotika i fungicida, kao i inaktivaciju toplinom i svjetlom. Mnoga sredstva za sterilizaciju su toksična za biljna tkiva pa stoga treba odrediti optimalne koncentracije sredstava za sterilizaciju, trajanje izloženosti eksplantata



sterilantima, redosljed upotrijebljenih sredstava za sterilizaciju i tako dalje kako bi se smanjila ozljeda eksplantata i postiglo bolje preživljavanje (CPRI 1992).

Velika potražnja za biljnim materijalom nevena u proizvodnji biljnih lijekova i kozmetike, pretvara tehniku kulture biljnog tkiva u jednu od alternativa za poboljšanje usjeva u kratkom vremenskom razdoblju. Protokol za kulturu tkiva razvijen je iz segmenata klijanaca *C. officinalis*, kako bi se poboljšala proliferacija izdanaka i korijena (Victório i sur., 2012.)

Victório i sur. (2012.) su koristili medij Murashige i Skoog (MS<sup>1/2</sup>N), smanjen na polovicu koncentracija NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> i KNO<sub>3</sub> kako bi provjerili učinak različitih vrsta eksplantata (bazalnih, intermedijarnih i apikalnih), medij koji je sadržavao pijesak s plaže kao potporu umjesto agara, i utjecaj auksina i citokinina (TDZ tidiazuron; BAP, 6-benzilaminopurin, IAA, indol-3-octena kiselina, IBA, indol-3-maslačna kiselina, NAA, naftalen-octena kiselina) na razvoj biljaka *in vitro* metodom. Rezultati su pokazali izraženije ukorjenjivanje iz vršnih eksplantata, kao i veće izduženje mladica i broja listova. Čvrsti medij bio je prikladniji za kulturu *C. officinalis*. Proliferacija izdanaka ovisila je o citokininima s boljim rezultatima utjecaja TDZ ili BAP u usporedbi s drugim tretmanima. Biljke regenerirane iz podloge koja je sadržavala TDZ imale su glazirani izgled i morfogetske deformacije. Najveća stopa ukorjenjivanja (80 %) postignuta je korištenjem IAA 0,1 mg/L. Razmnožavanjem *in vitro* dobili su zdrave biljke *C. officinalis* s korijenjem koje se može aklimatizirati, što omogućuje kontinuiranu nadopunu sirovina.

Prema Evansu (1990.) interes za *in vitro* uzgoj *Calendula officinalis* L. opravdan je korištenjem nekonvencionalne metode za procjenu mogućnosti izravne regeneracije.

Vantu (2015.) uspješno je postignula regeneraciju biljaka nevena umnožavanjem meristema pomoću vrhova izdanaka. MS (Murashige-Skoog) medij koji je koristila diverzificiran je prema hormonskoj ravnoteži, koristeći benzilaminopurin u kombinaciji s 2,4-diklorfenoksiocetnom kiselinom. Stvrdnuti MS medij s agarom koji je sadržavao 0,2 mg/L benzilaminopurina i 0,05 mg/L 2,4-diklorfenoksiocetane kiseline bio je optimalan za proliferaciju izdanaka *Calendula officinalis* L. I omogućio je razvoj velikog broja kloniranih izdanaka. *In vitro* regenerirane biljke nevena uspješno su aklimatizirane u *ex vitro* uvjete. Prva faza inicijacije kulture bila je kemijska sterilizacija eksplantata, operacija koja je završena u

zadovoljavajućih 90 %, dobivanjem materijala u aseptičnim uvjetima. Eksplantati apikalnog izdanaka, uzeti iz sadnica *Calendula officinalis* L. korišteni su za izravnu mikropropagaciju, u dvije faze: kaulogeneza, a zatim rizogeneza. Vrhovi izdanaka bili su izvor regeneracije *in vitro*.

Çetin i sur. (2015.) proveli su istraživanje kako bi se istražili različiti eksplantati regulatora rasta biljaka na indukciju kalusa ljekovite i aromatične biljke *Calendula officinalis* L. Sjeme su površinski sterilizirali korištenjem 70 % etanola 3 minute, 10 % komercijalnog izbjeljivača 5 minuta i isprano 3 puta sterilnom vodom 3 minute. Sjeme je proklimalo u mediju Murashige i Skoog (MS). Eksplantati hipokotila, kotiledona i čvorova supki izrezani su iz biljčica dobivenih iz *in vitro* klijalog sjemena. Uzgojili su tri eksplantata na MS mediju s dodatkom različitih koncentracija citokinina (BAP; 1,0, 2,0 mg/L) i auksina (IBA; 0,1, 0,5 mg/L) za indukciju kalusa. Nakon 8 tjedana, najbolji rezultati uočeni su u tretmanu s 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA i 2 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA 100 % na hipokotilu; 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA i 2 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA 88 % na kotiledonu; 2 mg/L BAP + 0,1 mg/L IBA 100 % na čvorove kotiledona. Dobiveni podaci korisni su za transformaciju gena, fitoremedijaciju i proučavanje stanične kulture

Çetin i sur. (2015.) u svom pokusu dobili su biljčice nevena koje su proklimalo na MS mediju tijekom dva tjedna i dosegle duljinu od 2 do 5 cm i postotak klijavosti iznosio je 46 %. Također su zaključili da različiti regulatori rasta biljaka nemaju značajnu statističku važnost na postotak indukcije kalusa eksplantata hipokotila *C. officinalis*. S druge strane, postoje zamjetne razlike u boji i tkivu na kalusu inducirane regulatorima rasta biljaka koji su primijenili na eksplantate hipokotila. Regeneracija izdanaka iz kalusa opažena je u MS mediju koji sadrži 1 mg/L-1BAP + 0,5 mg/L-1IBA.

Çöçü i sur. (2004.) su proveli istraživanje eksplantata hipokotila, kotiledona i kotiledonarnog čvora *Calendula officinalis* L. uzgajani su na Murashige i Skoog (MS) mediju s dodatkom različitih koncentracija tidiazurona (TDZ), kinetina (KIN),  $\alpha$ -naftalenoctene kiseline (NAA) i indol-3-maslačne kiseline (IBA) za poticanje regeneracije adventivnih izdanaka i mikropropagacije. Najveća učestalost adventivne regeneracije izdanaka postignuta je iz eksplantata hipokotila i kotiledona na MS podlozi s dodatkom 0,75 mg dm<sup>-3</sup> TDZ i 0,25 ili 0,50 mg dm<sup>-3</sup> IBA. Učinkovito *in vitro* klonsko razmnožavanje također je inducirano iz

kotiledonarnih čvorova na nizu medija s dodatkom 0,75 mg dm<sup>-3</sup> TDZ i 0,05 mg dm<sup>-3</sup> NAA ili 2 mg dm<sup>-3</sup> KIN i 1 mg dm<sup>-3</sup> NAA. Regenerirane izdanke su izrezali i ukorijenili u MS medij s dodatkom 1 mg dm<sup>-3</sup> NAA. Ukorijenjene sadnice uspješno su prebacili u posude.

#### **1.4. Cilj istraživanja**

Cilj istraživanja bio je ispitati najbolju metodu sterilizacije sjemena za dobivanje presadnice nevena (*Calendula officinalis* L.) pomoću *in vitro* metode klijanja sjemena na hranjivoj podlozi u laboratorijskim uvjetima.

## 2. MATERIJAL I METODE

Laboratorijski pokus započet je u svibnju 2022. godine u laboratoriju za povrćarstvo, cvjećarstvo, ljekovito, začinsko i aromatično bilje na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Za istraživanje je korišteno sjeme *Calendula officinalis* L. Kupljeno u trgovačkom centru. Proizvođač sjemena je Gartenland GmbH Aschersleben (Njemačka) (slika 5.).



Slika 5. Sjeme nevena, Gartenland GmbH Aschersleben  
Izvor: Valenčak M.

Za istraživanje je bio potreban slijedeći pribor:

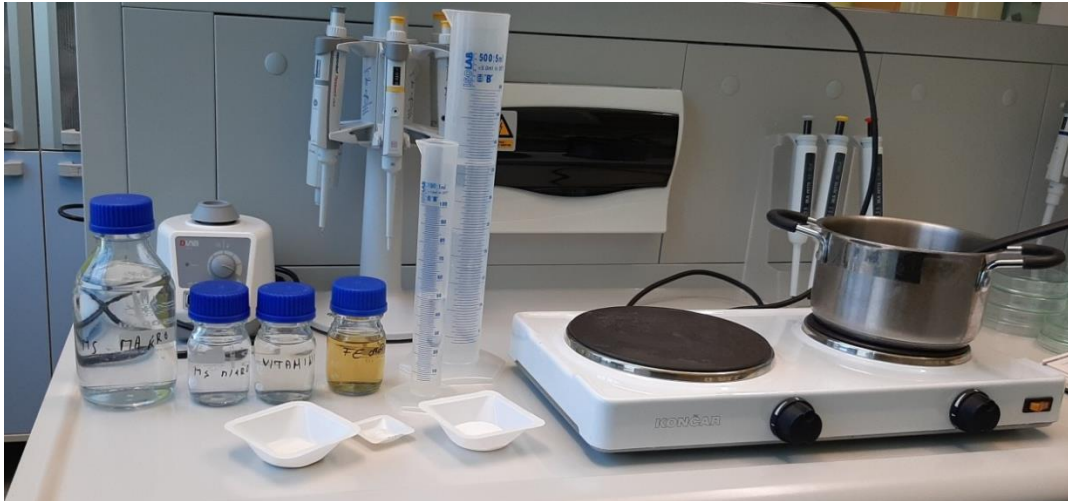
- Flomaster
- Pincete
- Fotoapararat
- pH metar

- Autoklav
- Laminar
- Pipeta
- Menzura
- 45 Erlenmeyer tikvica i 45 čepova za Erlenmeyer tikvice
- Hranjiva podloga
- Lonac
- Destilirana voda i alkohol
- Laptop za izradu završnog rada

## 2.1 Priprema za pokus

Pripremanje za pokus započelo je pripremom hranjive podloge. Hranjiva podloga pripremljena je prema recepturi Murashige i Skoog (1962.) na sljedeći način (slika 6.):

- U lonac je potrebno usuti destiliranu vodu i zagrijati na električnom kuhalu. Kada se voda zagrije dodaje se agar te mješa dok voda ne prokuha. Nakon što je voda prokuhala dodaje se šećer odnosno saharoza. Pipetom se dodaje potrebna količina mikroelemenata (1 mL), makroelemenata (100 mL), vitamina (1 mL) i željeza(5 mL), nakon čega se hranjiva podloga prelije u menzuru i dopuni do određenog volumena.
- Hranjiva podloga se zatim ponovno vraća u lonac radi podešavanja pH na 5,8 (slika 7.) korištenjem HCl ili NaOH. Konačni pH određuje se pomoću pH metra
- U svaku Erlenmeyer tikvicu izlije se po 50 mL hranjive podloge te se nakon toga tikvice čvrsto zatvore čepovima za tikvice i zajedno sa potrebnim priborom se steriliziraju u autoklavu na 121 °C 17 minuta.



Slika 6. Priprema hranjive podloge  
Izvor: Valenčak M.



Slika 7. pH hranjive podloge nakon uštivanja  
Izvor: Valenčak M.

Nakon što su se potrebni pribor i podloge ohladile potrebno ih je izvaditi iz autoklava te pripremiti 225 sjemenki sterilizacijom u predviđenom postotku otopine varikine i držanjem određeno vrijeme u njoj. U svaku Erlenmeyer tikvicu stavljalo se po pet sjemenku. Erlenmeyer tikvice su se razvrstavale u 9 tretmana, za svaki tretman korišteno je po 5 tikvica (slika 9.). Tretmani su se razlikovali kod sterilizacije sjemenki i vremenu stajanja sjemenki u otopini za sterilizaciju (slika 8.).



Slika 8. Sjemenke u različitom postotku varikine  
Izvor: Valenčak M.

Tri tretmana su se sastojala od sjemenki koje su bile u otopini koja je sadržavala 20 % varikine, u jednoj od ta tri tretmana sjemenke se se držale 15 minuta u otopini varikine, u drugom tretmanu 20 minuta te u trećem 30 minuta. Iduća dva tretmana su se sastojala od sjemenki koje su bile u otopini koja je sadržavala 15 % varikine, u jednoj od tih tretmana sjemenke su se držale po 20 minuta u otopini varikine, a u drugom tretmanu 30 minuta. Slijedeća dva tretmana su se sastojala od sjemenki koje su bile u otopini koja je sadržavala 10 % varikine, u jednom od tih tretmana sjemenke su se držale 20 minuta u otopini varikine, a u drugom tretmanu 30 minuta. U jednom od ostala dva tretmana, otopina u kojoj su bile sjemenke je sadržavala 70 % etilnog alkohola, a u drugom tretmanu sjemenke su bile isprane samo u vodi radi kontrole.



Slika 9. Pripremljena podloga u Erlenmeyer tikvicama  
Izvor: Valenčak M.

Nakon što su sjemenke sterilizirane u određenoj otopini, trebalo ih je u strogo steriliziranim uvjetima, laminarnom zaštitnom uređaju, pažljivo pomoću pincete staviti u Erlenmeyer tikvice na hranjivu podlogu te ih dobro zatvoriti i skladištiti na 7 dana.



### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj izvođenja ovog pokusa bio je utvrditi i ispitati utjecaj različitih koncentracija sredstava za sterilizaciju (varikina i etanol) i trajanja sterilizacije sjemenki nevena kako bi se odredio najučinkovitiji postupak za dobivanje sadnica *Calendula officinalis* L. *in vitro* metodom klijanja sjemenki na hranjivoj podlozi.

Nakon 7 dana od postavljanja sjemenki na hranjive podloge u Erlenmeyer tikvice, pregledani su dobiveni rezultati (tablica 1., tablica 2.). Rezultati su pokazali kako je različiti utjecaj koncentracija i trajanja sredstva za sterilizaciju sjemenki imao značajno najveći postotak nekontaminiranog sjemena (56 %) (slika 11.). Bile su u najvećoj koncentraciji varikine (20 %) i najdužem vremenskom intervalu (30 minuta).

Tablica 1. Prikaz postotka nekontaminiranih sjemenki u tretmanima sterilizacije varikinom

Koncentracija varikine/vrijeme			
	15min	20min	30min
10 %	/	4 %	28 %
15 %	/	24 %	12 %
20 %	36 %	28 %	56 %

Tablica 2. Prikaz postotka nekontaminiranih sjemenki u tretmanima sterilizacije s vodom i 70 % etilnim alkoholom

Tretman	Vrijeme	Nekontaminirane sjemenke %
voda	30 min	0 %
70 % etilnog alkohola	1 min	12 %

#### 3.1. Učinak različitih tretmana na kontaminaciju

U usporedbi sa sjemenkama koje su isprane u vodi, svi tretmani sterilizacije imali su bolji učinak. Jedino u toj metodi su sve sjemenke bile kontaminirane (100 % kontaminacija) te su hranjive podloge i sjemenke bile kontaminirane i s bakterijom i gljivicom (slika 10.), dok kod

ostalim metoda sterilizacije je bilo pojedinih podloga koje su kontaminirane samo s jednom skupinom mikroorganizama i nalazio se određeni postotak nekontaminiranih sjemenki (slika 11., slika 12., slika 13., slika 14., slika 15., slika 16., slika 17., slika 18.).



Slika 10. Rezultati kontaminacije kod metode ispiranja sjemenki u vodi, 0 % nekontaminiranih sjemenki

Izvor: Valenčak M.



Slika 11. Rezultati kontaminacije kod metode sterilizacije sjemenki 30 minuta u otopini koncentracije od 20 % varikine, 56 % nekontaminiranih sjemenki

Izvor: Valenčak M.

Različiti vremenski interval držanja sjemenki u otopini varikine jednake koncentracije imalo je utjecaja kao i različita koncentracija otopine varikine u kojoj su bile sterilizirane sjemenke. Najveći postotak nekontaminiranih sjemenki (56 %), sterilizirale su se u koncentraciji od 20 % varikine i 30 minuta držanja u njoj (slika 11.). Slijedeći najveći postotak nekontaminiranih sjemenki iznosio je 36 %, sjemenke su se sterilizirale u koncentraciji od 20 % varikine i 15 minuta držale u njoj (slika 12.). Tretman u kojem su se sjemenke sterilizirale 20 minuta u koncentraciji od 20 % varikine, iznosio je 28 % nekontaminiranih sjemenki (slika 13.). Isti postotak nekontaminiranih sjemenki (28 %) nalazio se u tretmanu u kojem su se sjemenke sterilizirale 30 minuta u koncentraciji od 10 % varikine, također u tom tretmanu se nalazila 1 hranjiva podloga koja jedina nije bila kontaminirana (slika 14.). Slijedeći tretman iznosio je 24 % nekontaminiranih sjemenki, u njemu su se sjemenke sterilizirale 20 minuta u koncentraciji od 15 % varikine (slika 15.). Slijedeća dva tretmana iznosila su 12 % nekontaminiranih sjemenki, u jednom tretmanu sjemenke su sterilizirane 30 minuta u koncentraciji od 15 % varikine (slika 16.), a u drugom tretmanu sjemenke su sterilizirane u 70 % etilnom alkoholu (slika 17.). Hranjiva podloga u kojoj su bile sjemenke koje su se sterilizirale 20 minuta u koncentraciji od 10 % varikine, sadržavala je 4 % nekontaminiranih sjemenki (slika 18.), a kontrolni tretman u kojem su se sjemenke držale u vodi iznosio je 0 % nekontaminiranih sjemenki (slika 10.).



Slika 12. Rezultati kontaminacije kod metode sterilizacije sjemenki 15 minuta u otopini koncentracije od 20 % varikine, 36 % nekontaminiranih sjemenki

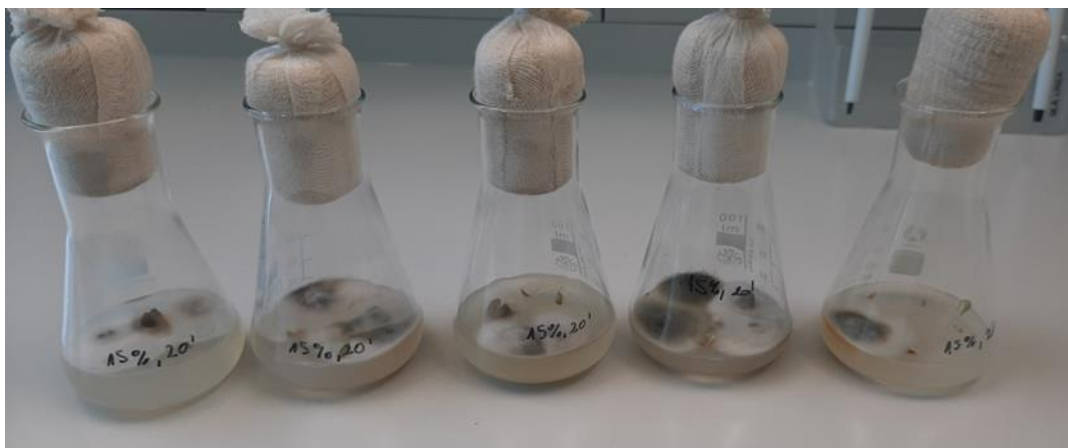
Izvor: Valenčak M.



Slika 13. Rezultati kontaminacije kod metode sterilizacije sjemenki 20 minuta u otopini koncentracije od 20 % varikine, 28 % nekontaminiranih sjemenki  
Izvor: Valenčak M.



Slika 14. Rezultati kontaminacije kod metode sterilizacije sjemenki 30 minuta u otopini koncentracije od 10 % varikine, 28 % nekontaminiranih sjemenki  
Izvor: Valenčak M.



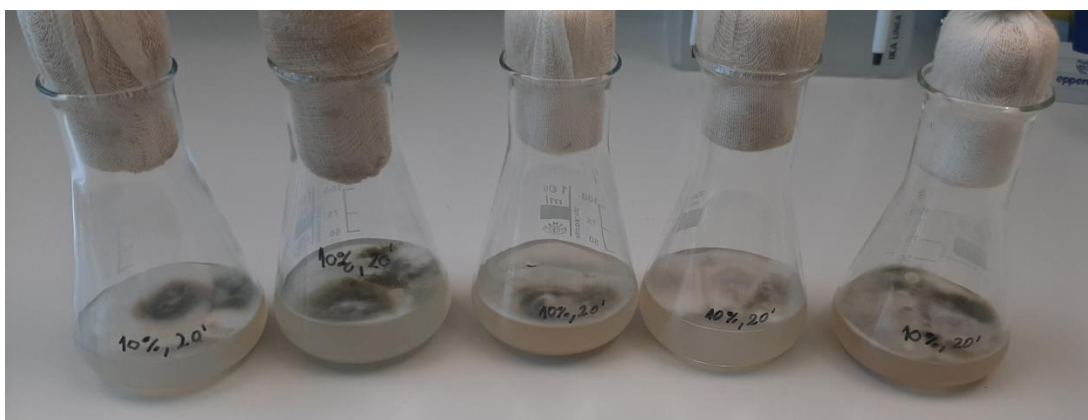
Slika 15. Rezultati kontaminacije kod metode sterilizacije sjemenki 20 minuta u otopini koncentracije od 15 % varikine, 24 % nekontaminiranih sjemenki  
Izvor: Valenčak M.



Slika 16. Rezultati kontaminacije kod metode sterilizacije sjemenki 30 minuta u otopini koncentracije od 15 % varikine, 12 % nekontaminiranih sjemenki  
Izvor: Valenčak M.



Slika 17. Rezultati kontaminacije kod metode sterilizacije sjemenki u 70 % etilnom alkoholu, 12 % nekontaminiranih sjemenki  
Izvor: Valenčak M.



Slika 18. Rezultati kontaminacije kod metode sterilizacije sjemenki 20 minuta u otopini koncentracije od 10 % varikine, 4 % nekontaminiranih sjemenki  
Izvor: Valenčak M.

U ovom istraživanju primijenjena su različita sredstva za sterilizaciju u različitim koncentracijama i vremenima izlaganja kako bi se odredio optimalni protokol za sterilizaciju površine sjemenki i početak kulture tkiva *Calendula officinalis* L. Sjemenke su se nakon sterilizacije stavljale na hranjivu podlogu te skladištile u steriliziranim uvjetima na 7 dana.

Ispitivani tretmani pri različitim vremenskim intervalima i sredstvima za sterilizaciju u različitim koncentracijama provodili su se na sljedeće načine:

- ispiranjem sjemenki u vodi 30 minuta radi kontrole,
- sterilizacijom sjemenki u 70 % etilnom alkoholu i
- sterilizacijom sjemenki u otopini varikine različitih koncentracija (10 %, 15 %, 20 %) i vremenskim intervalima (15 minuta, 20 minuta i 30 minuta)

Prema podacima koji su zabilježeni nakon 7 dana i statistički obrađeni o ispitivanim tretmanima, najučinkovitijom metodom pokazala se ona u kojoj su se sjemenke sterilizirale 30 minuta u otopini od 20 % varikine, iznosio je najveći postotak nekontaminiranih sjemenki (56 %). Tretman s 70 % etilnim alkoholom iznosio je samo 12 % nekontaminiranih sjemenki te se ispostavio neučinkovitim sredstvom za sterilizaciju površine sjemena.

Mihaljević i sur. (2013.) spominju kako se najčešće korišteni postupci sterilizacije za mikropropagaciju provode sa 70 % etanolom i 1-3% NaOCl. Njihovi provedeni rezultati su pokazali da su tijekom postupka sterilizacije neke druge kemikalije poput AgNO<sub>3</sub>, Ca(ClO)<sub>2</sub> i HgCl<sub>2</sub> također pokazale dobre rezultate. Tvrdi kako se to može objasniti činjenicom da su zahtjevi za sterilizaciju različiti i ovise o vrsti tkiva i prirodi eksplantata koji se koristi za mikropropagaciju.

Bloomfield (1978.) navodi kako je etanol jako, izuzetno fitotoksično sredstvo za sterilizaciju. Iz tog razloga kada se koristi, biljni materijal treba kratkotrajno biti izložen. Kako bi se poboljšala učinkovitost postupka sterilizacije, etanol se općenito koristi prije tretiranja s drugim spojevima. Zabilježeno je da su alkoholi više baktericidni, nego bakteriostatski protiv vegetativnih oblika bakterije; također su tuberkulocidni, fungicidni i virucidni, ali ne uništavaju bakterijske spore. Gross (1987.) također spominje kako alkoholno cidno djelovanje naglo pada kada se razrijede ispod 50 % koncentracije, a optimalna baktericidna koncentracija je 60 % do 90 % otopine u vodi

Zabilježeno je da je natrijev hipoklorit vrlo učinkovit protiv mnogih vrsta bakterija; čak su i mikromolarne koncentracije dovoljne za značajno smanjenje bakterijske populacije (Nakagawara i sur., 1998). Također u istraživanjima Wlodkowski, Rosenkranz (1975.) i Dukan i sur. (1999.) je objavljeno da, kada se razrijede s vodom, korištene hipokloritne soli

[NaOCl, Ca(OCl)<sub>2</sub>, LiOCl i KOCl] dovode do stvaranja HClO, čija je koncentracija u negativnoj korelaciji s baktericidnim djelovanjem, možda djelomično zbog smrtonosnog oštećenja DNK.

U ispitivanim tretmanima koristila se otopina varikine za sterilizaciju sjemenki. Korištena varikina sadrži natrijev tosilkloramid (0,09 %) i natrijev hipoklorit (26,67 %). Dobiveni rezultati prikazuju bolji postotak nekontaminacije kod sterilizacije sjemenki u otopini varikine, od sterilizacije u 70 % etilnom alkoholu. Također najbolji postotak nekontaminacije je bio kod najveće koncentracije varikine i najdužeg vremenskog perioda izlaganja sjemenki u otopini.

Upotreba natrijevog hipoklorita za površinsku sterilizaciju biljnih eksplantata iz različitih izvora je naširoko primjenjena (Miche i Balandreau, 2001; Vejsadova, 2006; Badoni i Chauhan, 2010; Maina i sur., 2010; Colgecen i sur., 2011; Morla i sur., 2011 ).

Prema rezultatima Monokesh Kumer i sur. (2013.) primjena otopina natrijevog hipoklorita tijekom 30 minuta bio je najučinkovitiji tretman. Pri višim koncentracijama ostalih sredstava (etanol, živin klorid, Flugal i Nystatin) za sterilizaciju pokazala su maksimalni učinak protiv mikrobiološke kontaminacije, iako je postotak preživljavanja bio nizak



#### 4. ZAKLJUČAK

Na temelju laboratorijskih istraživanja, provedenih u laboratoriju fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, utjecajem različitih metoda sterilizacije sjemena nevena (*Calendula officinalis*) radi određivanja najučinkovitijeg postupka za dobivanje sadnica *in vitro* metodom klijanja sjemenki, može se zaključiti sljedeće:

- Najučinkovitija metoda pokazala se ona u kojoj je otopina sadržavala 20 % varikine u vremenskom periodu od 30 minuta. Postotak koncentracije varikine u otopini i duljina vremenskog intervala direktno utječu na učinkovitost suzbijanja koncentracije.
- Kontaminacija hranjivih podloga iznosila je 44 od 45 te se utjecaj različitih tretmana sterilizacije sjemenki nije ispostavio potpuno učinkovit. Ostatak nekontaminiranih sjemenki na kontaminiranim hranjivim podlogama naposljetku bi završile kontaminirane.

## 5. POPIS LITERATURE

1. Badoni A., Chauhan J.S. (2010.): In vitro sterilization protocol for micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri Himalini'. *Academia Arena* 2: 24–27.
2. Biotehnoška istraživanja i razvoj: *In vitro* umnožavanje.  
<http://www.biotech.hr/djelatnosti/proizvodnja/> (23.6.2022.)
3. Bloomfield S.F. (1978.): A review: The use of disinfectants in the home. *J. Appl. Bacteriol.* 45 (4): 1–38.
4. Brozinčević, I.: Druga strana lončića. 16.2.2022.  
<https://mraclin.hr/druga-strana-loncica/> (23.6.2022.)
5. Çetin B. (2015.): Effects of Plant Growth Regulators on Callus Formation in Different Explant of *Calendula officinalis* L. *Journal of Applied Biological Sciences* 9 (3): 34–39.
6. Colgecen H., Koca U., Toker G. (2011.): Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turkish J. Biol.* 35: 513–520.
7. CPRI (Central Potato Research Institute) (1992.): *Tissue Culture Technique for Potato Health, Conservation, Micropropagation and Improvement*. CPRI, Shimla, 23.
8. Çöçü, S., Uranbey, S., İpek, A., Khawar, K. M., Sarihan, E. O., Kaya, M. D., Parmaksiz, I. i Özcan, S. (2004.): Adventitious shoot regeneration and micropropagation in *Calendula officinalis* L. *BIOLOGIA PLANTARUM* 48 (3): 449–451.
9. Dodds, J.H., Roberts, L.W. (1985.): *Experiments in Plant Tissue Culture*. 2nd Edition. Cambridge University Press, Cambridge. 231.
10. Dukan, S., Belkin, S., Touati, D. (1999.): Reactive oxygen species are partially involved in the bactericidal action of hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 367: 311–316.
11. Evans, E., (1990): *Micropropagation - Plant Cell and Tissue Culture*, Humana Press Inc., Totowa NJ, Vol. 6: 93-103.
12. Gautheret, R. (1939.): Sur la possibilite´ de re´ aliser la culture inde´ finie des tissues de tubercules de carotte. *C. R. Soc. Biol. Paris* 208:118–120.

13. Gligić, V. Etimološki botanički rečnik, 1953. <https://www.plantea.com/hr/neven>  
(22.6.2022.)
14. Gross M. A. (1987.): Assessment of the Effects of Household Chemicals Upon Individual Septic Tank Performances. Arkansas Water Resources Research Center, University of Arkansas, Fayetteville, AR.
15. Haberlandt, G. (1902.): Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J. 111, 69–92.
16. Hall, B. *Calendula officinalis* care: how to keep them happy. The Indoor Nursery 14.12.2021.  
<https://theindoornursery.com/glossary/types-of-calendula/calendula-officinalis-care/>  
(21.6.2022.)
17. Horvat, M. Najljekovitije biljke svijeta: neven.  
<https://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/neven>  
(23.6.2022.)
18. Elbi Medikal. Ljekoviti neven. 10.9.2019. <https://elbi-medikal.hr/ljekoviti-neven/>  
(22.6.2022.)
19. Khalid, K, A. i Teixeira da Silva, J. A. (2011.): Biology of *Calendula officinalis* Linn.: focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. Global Science Books.
20. Kolar-Fodor, S. Neven- lat. *Calendula officinalis*. Biovrt- u skladu s prirodom. 17.4.2010.  
<https://www.biovrt.com/neven-lat-calendula-officinalis/> (21.6.2022.)
21. Maina S.M., Emongor Q., Sharma K.K., Gichuki S.T., Gathaara M., de Villiers S.M. (2010.): Surface sterilant effect on the regeneration efficiency from cotyledon explants of groundnut (*Arachis hypogea* L.) varieties adapted to eastern and Southern Africa. African J. Biotechnol. 9: 2866–2871.
22. Mihaljević, I., Dugalić, K., Tomaš, V., Viljevac, M., Pranjić, A., Čmelik, Z., Puškar, B., Jurković, Z. (2013.): IN VITRO STERILIZATION PROCEDURES FOR MICROPROPAGATION OF ‘OBLAČINSKA’ SOUR CHERRY. Journal of Agricultural Sciences Vol. 58, No. 2, Pages 117-126

23. Miche L., Balandreau J. (2001.): Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3046–3052.
24. Monokesh Kumer, S., M. Abu Hena, M. J. i Shamima, N. *Environmental and Experimental Biology* (2013.): Sterilization factors affect seed germination and proliferation of *Achyranthes aspera* cultured *in vitro*. 11: 119–123.
25. Morla S., Rao C.S.V.R., Chakrapani R. (2010.): Factors affecting seed germination and seedling growth of tomato plants cultured *in vitro* conditions. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* 1: 328–334.
26. Nakagawara S., Goto T., Nara M., Ozawa Y., Hotta K., Arata, Y. (1998.): Spectroscopic characterization and the pH dependence of bactericidal activity of the aqueous chlorine solution. *Anal. Sci.* 14: 691–698.
27. Nobécourt, P. (1939.): Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *Compt. Rendus Soc. Biol. Lyon* 130: 1270–1271.
28. Parađiković, N. *Osnove florikulture*. World documents. 2014.  
<https://vdocuments.net/paradikovic-n-2014-osnove-florikulture.html?page=1>  
(21.6.2022.)
29. Plavšić, D. Neven je ljekovit i za ljude i za biljke. *Agroklub*. 16.7.2017.  
<https://www.agroklub.com/hortikultura/neven-je-ljekovit-i-za-ljude-i-za-biljke/34249/>  
(22.6.2022.)
30. Schwann, T., Schleyden, M. J. (1847.): *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants*. Printed for the Sydenham Society, London. 268.
31. Singh A.K., Chand S. (2003.): Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree *Dalbergia sissoo* Roxb. *J. Plant Physiol.* 160: 415–421.
32. Skoog, F., Miller, C. O. (1957.): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118–131.
33. Šilješ, I., Grozdanić, D., Grgesina, I. (1992.): *Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja*. Školska knjiga. 150.

34. Vantu, S. (2015.): “IN VITRO” MULTIPLICATION OF *CALENDULA OFFICINALIS* L. Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară TOM XVI, Fascicula 3
35. Vejsadova H. (2006.): Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro. Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot. 48: 109–113.
36. Vinterhalter, D., Vinterhalter, B. (1996.): Kultura in vitro i mikropropagacija biljaka. Axial, Beograd.
37. Victório, C. P. i sur. (2012.): Tissue culture techniques in the proliferation of shoots and roots of *Calendula officinalis*. Revista Ciência Agronômica, 43 (3): 539-545.
38. Wlodkowski T.J., Rosenkranz H.S. (1975.): Mutagenicity of sodium hypochlorite for *Salmonella typhimurium*. Mutat. Res. 31: 39–42.