

Mikropropagacija vegetativne podloge agruma (Poncirus trifoliata Raf.) in vitro

Horvat, Matej

Undergraduate thesis / Završni 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:151:268655>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-16**



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

Matej Horvat

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Mikropropagacija vegetativne podloge agruma
(*Poncirus trifoliata* Raf.) *in vitro*

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Matej Horvat

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Mikropropagacija vegetativne podloge agruma

(Poncirus trifoliata Raf.) in vitro

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. mag.ing.agr. Dejan Bošnjak, mentor
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, član
3. dr.sc. Monika Tkalec Kojić, član

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Završni rad

Mikropropagacija vegetativne podloge agruma (*Poncirus trifoliata* Raf.) *in vitro*

Matej Horvat

Sažetak: U rasadničkoj proizvodnji važnu ulogu ima kontinuirano uvođenje suvremenih *in vitro* metoda klonskog razmnožavanja reprodukcijaskog materijala. *Poncirus trifoliata* Raf. je najzastupljenija i najvažnija podloga mandarine Unšiu u Hrvatskoj i drugim proizvodnim zemljama svijeta. Istraživanje o mogućnosti mikropropagacije vegetativne podloge agruma *Poncirus trifoliata* Raf. provedeno je na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek tijekom 2020. godine. Ispitivan je utjecaj pojedinih biljnih regulatora rasta (BAP, IBA, Zeatin i GA₃) na mogućnost proliferacije i organogeneze nodijalnih eksplantata iniciranih na MS hranjivi medij. Najbolji rezultati dobiveni su na tretmanu T1 koji je uključivao kombinaciju citokinina BAP i auksina IBA. Na ovom tretmanu zabilježena je najmanja stopa kontaminacije i odumrlih eksplantata. Zdravi eksplantati T1 tretmana uključeni su u daljnju fazu multiplikacije. Nakon nekoliko uspješnih ciklusa multiplikacije dobiven je dovoljan broj novih zdravih mikrobiljaka na kojim će se obavljati brojna druga istraživanja.

Ključne riječi: *Poncirus trifoliata* Raf., mikropropagacija, organogeneza, nodijalni eksplantati

25 stranica, 3 tablica, 15 slika, 31 literaturni navod

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

BSc Thesis

Micropropagation of citrus rootstock (*Poncirus trifoliata* Raf.) *in vitro*

Matej Horvat

Summary: The continuous introduction of modern *in vitro* methods in clonal propagation of plating material plays an important role in nursery plants production. *Poncirus trifoliata* Raf. is the most represented and most important rootstock of mandarin Unshiu in Croatia and other production countries. Research on the possibility of micropropagation citrus vegetative rootstock *Poncirus trifoliata* Raf. was conducted at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek during 2020. The influence of individual plant growth regulators (BAP, IBA, Zeatin and GA₃) on the possibility of proliferation and organogenesis of nodal explants initiated on MS nutrient medium was investigated. The best results was obtained on T1 treatment, which included a combination of cytokine BAP and auxin IBA. This treatment has the lowest rate of contamination and dead explants. Healthy explants of T1 treatment are included in the further phase of multiplication. After several successful multiplication cycles, a sufficient number of new healthy microplants have been successfully obtained on which numerous other researches will be performed.

Keywords: *Poncirus trifoliata* Raf., micropropagation, organogenesis, nodal explants

25 pages, 3 tables, 15 figures, 31 references

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

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Porijeklo i rasprostranjenost <i>Poncirus trifoliata</i> Raf..... | 2 |
| 1.2. Upotreba <i>Poncirus trifoliata</i> Raf. u voćarskoj proizvodnji | 2 |
| 1.3. Morfološke karakteristike i razmnožavanje <i>Poncirus trifoliata</i> Raf. | 3 |
| 1.3.1. Okuliranje..... | 7 |
| 1.3.2. Cijepljenje na isječak..... | 8 |
| 1.3.3. Cijepljenje sa strane pod koru..... | 8 |
| 1.3.4. Cijepljenje na most..... | 9 |
| 1.4. Virus tristeza (CTV virus) i simptomatologija..... | 9 |
| 1.5. Mikropropagacija agruma – kultura tkiva <i>in vitro</i> | 12 |
| 2. MATERIJAL I METODE | 14 |
| 2.1. Opis laboratorija i cilj istraživanja..... | 14 |
| 2.2. Postavljanje istraživanja, sterilizacija i tretmani u pokusu..... | 15 |
| 2.3. Mjerenja u istraživanju..... | 17 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA | 18 |
| 3.1. Učinkovitost tretmana u proliferaciji (organogeneza) nakon 15 dana..... | 18 |
| 3.2. Učinkovitost tretmana u proliferaciji (organogeneza) nakon 30 dan..... | 20 |
| 3.3. Multiplikacija eksplantata..... | 21 |
| 4. ZAKLJUČAK | 22 |
| 5. POPIS LITERATURE | 23 |

1. UVOD

U rasadničkoj proizvodnji važnu ulogu predstavlja kontinuirano uvođenje suvremenih *in vitro* metoda klonskog razmnožavanja reprodukcijaskog materijala. *Poncirus trifoliata* Raf. je najzastupljenija i najvažnija podloga mandarine Unšiu (*C. unshiu*) u Hrvatskoj i drugim proizvodnim zemljama svijeta. Razmnožavanje podloga agruma u rasadnicima većinom je bazirano na proizvodnji sadnica nucelarnom tehnikom. Mikropropagacija je u pojedinim zemljama svijeta postala uobičajena metoda koja osigurava masovnost u proizvodnji uz prevladavanje nedostataka nucelnog tipa razmnožavanja.

Potencijal konvencionalnih metoda u oplemenjivačkom programu limitiran je fiziološkim čimbenicima kao što su: heterozigotnost, inbreeding, nucelarna poliembrija i juvenilnost. U takvim uvjetima napredna tehnika kulture tkiva *in vitro* osigurava masovnu proizvodnju rezistentnih potomaka elitnih genotipova agruma. Mikropropagacija podloga agruma je zahtjevna, a uspjeh ovisi o nekoliko čimbenika: genotip, starost eksplantata, hranjiva podloga i koncentracija biljnih regulatora rasta koji utječu na sposobnost regeneracije.

U svijetu postoji više vrsta, odnosno klonova *Poncirus trifoliata* Raf. pa s toga prevladava i velika diversifikacija sadnog materijala u rasadnicima. Proizvodnja podloga za agrume u Hrvatskoj ne postoji te se ona uglavnom bazira na uvozu gotovog sadnog materijala iz etabliranih rasadničarskih kuća Italije, Francuske, Španjolske, itd.

Tijekom izrade ovog završnog rada, odnosno pretraživanjem Internet baze nije pronađeno niti jedno domaće istraživanje na ovu temu što ujedno ovaj rad čini jedinstvenim i prvim u našoj zemlji.

Istraživanje je provedeno na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (*in vitro* laboratorij za voćarstvo) tijekom 2020. godine. Cilj ovog završnog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnost proliferacije i organogeneze nodijalnih eksplantata, odnosno mikropropagacije vegetativne podloge agruma *Poncirus trifoliata* Raf. upotrebom različitih biljnih regulatora rasta (citokinina i auksina) na MS hranjivoj podlozi.

1.1. Porijeklo i rasprostranjenost *Poncirus trifoliata* Raf.

Poncirus trifoliata (L.) Raf. porijeklom je iz Centralne Kine, gdje je poznata više od 4000 godina. Na kineskom jeziku zove se „Chih“, te ujedno prvi put opisana i ilustrirana u Kini 1108. godine. Već 1712. godine spominje se u Kaemferovoj knjizi. Nedugo zatim, 1763. godine opisao ju je Karl Linne kao trolisnu naranču (*Citrus trifoliata*). De Candole svrstao ju je u rod *Aegle* i nazvao *Aegle sepiaria*. Sadašnje ime nadjenio joj je Rafinesk. Uzgaja se u Centralnoj i Sjevernoj Kini, Europi, Sjevernoj i Južnoj Americi, te u Japanu gdje je poznata pod imenom „Karatači“. Nije poznato kada je uvezena u Hrvatsku. Među prvim stablima nalazi se onaj koji je prije I. svjetskog rata uzgajan i razmnožavan u Arboretumu Trsteno. Plod sadrži dosta smolastih tvari i glikozid Ponciridin koji nisu za jelo, već se koriste sjemenke za proizvodnju sjemenjaka – podloga za Citruse. Kinezi suhe plodove koriste u ljekarske svrhe.

1.2. Upotreba *Poncirus trifoliata* Raf. u voćarskoj proizvodnji

Poncirus trifoliata Raf. je najzastupljenija i najvažnija podloga mandarine Unšiu u svijetu, te ujedno i kod nas. U zapadnim zemljama poznato je nekoliko vrijednih selekcioniranih klonova Poncirusa, a neki od njih su: Rusk, Christian, Flying, Dragon i Yamaguski. Razlike između ovih klonova su u veličini cvijeta, rastu i razvoju, zdravstvenom stanju (virus free). Kao podloga za mandarinu Unšiu, u Hrvatsku su uvezeni neki od ovih klonova.

U Japanu je registrirano oko 18 klonova *Poncirus trifoliata*, a najznačajniji su oni patuljastog rasta te su stabla niskog uzgojnog oblika. U Rusiji postoje brojne selekcije s obzirom na morfološke osobine i ritam rasta. Rašireni su tipovi: Skoroplodna ili Poncirus duge cvatnje, Skorospjelka ili poncirus kratkog vegetacijskog perioda, Karlik ili patuljasti, te Tetraploid No.2. Za navedene tipove karakterističan je bujan i patuljast rast. Po kvaliteti rasta javljaju se: diploidne ($2n=18$), tetraploidne ($2n=36$) i poliploidne forme poncirusa. Razlike između formi mogu se približno točno uočiti tek treće godine po intenzitetu rasta. Iz proizvodnji se isključuju svi sjemenjaci zaostali u rastu jer su oni nosioci slabog rasta i

razvoja budućeg stabla. Kako se *Poncirus trifoliata* razmnožava sjemenom, u svijetu se poklanja velika pažnja u odabiranju kvalitetnih matičnih stabala.

1.3. Morfološke karakteristike i razmnožavanje *Poncirus trifoliata* Raf.

Poncirus trifoliata je listopadni grm ili stablo iz porodice Ruta (*Rutaceae*). Dosegne visinu do pet metara tvoreći grane prekrivene dugačkim trnovima. Listovi su naizmjenični, mali, trodijelni, eliptičnih lisaka nazubljenih rubova (Slika 1.). Kada se smrve među prstima, mirisni su. Cvjetovi su krupni, čine ih pet bijelih, međusobno razmaknutih latica. Imaju mnogobrojne prašnike. Vrijeme cvatnje je mjesec travanj i svibanj. Plodovi su okrugli, promjera 3 – 4 cm (Slika 1.). U početku su zeleni, te dozrijevanjem u listopadu postanu žuti. Na stablu mogu ostati i tokom zime (Bakarić, 1983.).



Slika 1. *Poncirus trifoliata* Raf. (Izvor: <https://futureforests.ie/>)

Na temelju provedenih istraživanja i provjerenih podloga *Poncirus* ima karakteristike koje se najpozitivnije odražavaju na biološka i gospodarska svojstva mandarine Unšiu. Povoljni utjecaji *Poncirusa* na mandarinu Unšiu potječu iz genetskih, citoloških, anatomske – morfoloških osobina, budući da je listopadna biljka. Rijetko je u voćarstvu da na listopadnoj podlozi uspješno i ekonomski isplativo raste zimzelena plemka. Iz izrazitih razlika ovih dvaju individua javlja se utjecaj na veliku korist čovjeka. Velika prednost *Poncirusa trifoliata* proizlazi iz toga što kao listopadna biljka rano završava vegetaciju i prelazi u period dosta dugog zimskog mirovanja. Za taj su period karakteristični jako smanjeni životni procesi i funkcije nadzemnog i podzemnog dijela, za razliku od zimzelene mandarine Unšiu. U fazi se mirovanja putem korijena vrlo slabo snabdijeva nadzemni dio (krošnja), što dovodi do slabe ili onemogućene funkcije stabla. Upravo taj proces i odgovarajuće smanjenje vode u cijelom stablu dovodi do pravovremenog dozrijevanja mladih dijelova krošnje, što ujedno pojačava opću otpornost na niske temperature, bez kvalitetno strukturiranih izmjena u staničju podloge i plemke (Bakarić, 1983.).

Podloga *Poncirus trifoliata* utječe na slabiji rast vegetacije, što se očituje u tome da stabla mandarine Unšiu ostaju niskog rasta, te ujedno ima niz prednosti u uspješnijem uzgoju. Podloga *Poncirusa* pospješuje zriobu i povećava kvalitetu ploda. Veliki značaj podloge *Poncirus* izražava se u većoj otpornosti na bolesti i štetnike u odnosu na druge podloge. Otporna je na opasne gljivične bolesti (Gumozu i *Phytophthora*), virusne bolesti (*Tristeza* i *Xyloporosis*), te napad nematode na korijenov sustav. Podloga *Poncirusa* ima i određene nedostatke, nije posve idealna za svaku priliku. Veoma je osjetljiva na veće količine aktivnog vapna te sadržaj klorida u tlu. Sadnja mandarine Unšiu nije poželjna na ovoj podlozi ukoliko u tlu ima više od 10% aktivnog vapna. Podloga *Poncirus trifoliata* traži dosta humusa u tlu, dok ne podnosi izrazito kamenita, pjeskovita i glinasto močvarna tla, suha, plitka i teška tla, te tla na kojima leži voda u toku vegetacije. Najbolji uvjeti za uzgoj *Poncirus trifoliata* su na pjeskovito – ilovastim, prozračnim i humusnim tlima s blago lužnatom reakcijom (pH 7.5 – 8.5). Najveći nedostatak je visoka osjetljivost na virus *Exocortis* (Bakarić, 1983.).

Na podlozi *Poncirus trifoliata* mandarine Unšiu stvaraju manje deblo od podloge. Starenjem stabla razlika u debljini postaje sve veća, a nastaje kao posljedica veće bujnosti

podloge od plemke Unšiu (Slika 2. A i B). Suvremena rasadnička proizvodnja temelji se na proizvodnji sadnica u posudama (kontejnerima). Nastoji se što više radova mehanizirati kako bi se olakšao rad čovjeka, te ujedno smanjila cijena sadnica (Bakarić, 1983.).



Slika 2. Stvaranje većeg debla od strane podloge (Izvor: <https://www.researchgate.net>)

Prema provedenim istraživanjima utvrđeno je da je podloga *Poncirus trifoliata* do sada dala najbolje rezultate za uzgoj mandarine Unšiu. Dokazano je da je velika vremenska razlika od zametanja plodova do tehnološke zrelosti plodova mandarine Unšiu različita ovisno o podlogama. Na *Poncirusu* to iznosi 116 dana, Citranžu 162 dana, a na vlastitom korijenu 166 dana. Iz toga se može zaključiti da *Poncirus* ima najviše prednosti kod uzgoja mandarine Unšiu kod nas (Bakarić, 1983.).

U plodu *Poncirus trifoliata* mogu se naći od 20 - 45 sjemenki što ga čini bogatim sjemenkama. Plod mora potjecati s matičnih stabala, te treba biti zdrav, normalno razvijen i posve zreo. Ukoliko je plod nezreli i nedovoljno razvijen ne daje dobre i klijave sjemenke. Nakon što plod otpadne sa stabla, skuplja se i čuva dok se ne počne kvariti, truliti ili pljesniviti. Plod se treba skladištiti u suhim i prozračnim prostorijama. Iako je sjemenke najbolje čuvati u plodu do same sjetve, u većini slučajeva to nije moguće (Bakarić, 1983.).

Da bi se spriječila pojava gljivica *Phytophthora*, sjemenke se iz ploda oslobađaju ispiranjem hladnom vodom. Prilikom ispiranja sve se šture i nepravilno razvijene sjemenke

odstranjuju. Kako bi spriječili pojavu bolesti koje se prenose sjemenkama, sjemenke se mogu prije sušenja močiti u toploj vodi (50 °C) u trajanju od 10 minuta, ili vodi u kojoj je izmiješan neki od fungicida na bazi Tirama ili Kvintozena (Bakarić, 1983.).

Poncirus trifoliata ima najveći postotak klijavog sjemena kada se uzima iz zrelog ploda. Sjemenke su najosjetljivije na isušivanje, te za razliku od drugih vrsta podloga za agrume, najbrže gube klijavost. Ukoliko su sjemenke samo jedan sat izložene suncu, ili pak u hladovini više nego što treba, klijavost se znatno smanji. Iz tog razloga je poželjno sjemenke ostavljati u plodu što je dulje moguće, po mogućnosti do same sjetve. Nakon ispiranja poželjno je da se sjemenke suše u hladovini na prozračnom mjestu, ali se u tome ne smije pretjerivati. Sušenje se prekida kada se utvrdi da su sjemenke dobile svoju karakterističnu svijetlo – sivu boju, te kada se primijeti da su na površini suhe.

Dobar način čuvanja sjemena je stratificiranje. Stratificiranje je radnja kojom se naizmjenično redaju slojevi pijeska i sjemenki do oko 30 cm ukupne debljine. Temperatura čuvanja sanduka sa stratificiranim sjemenkama je od 4 – 7 °C.

Sjemenke *Poncirusa trifoliata* mogu se čuvati do sjetve u zatvorenim polietilenskim vrećicama u hladnjačama na temperaturi od 3 – 7 °C, uz povišenu vlažnost (Bakarić, 1983.).

Citrusi se mogu razmnožavati:

- cijepljenjem (kalemljenjem)
- polaganjem
- reznicama
- sjemenom

Trenutačno je u rasadnicima najzastupljenije razmnožavanje cijepljenjem, i to okuliranjem.

Za podloge se obično uzimaju gorka naranča (igaradia, *Citrus aurantium*) i *Poncirus (Poncirus trifoliata)*. Za razliku od gorke naranče, *Poncirus* je mnogo otporniji na niskim zimskim temperaturama. Pozitivne osobine ove podloge su: velika širina prilagođenosti, lako razmnožavanje, te srednje bujan rast cijepa (kalema), koji dobro i dugo raste na

podlozi. Sjeme se sije u ožujku i travnju u sjemenište koje je dobro pripremljeno na isti način kao i za drugo voćno sjeme.

Cijepljenje je proces unošenja vegetativnih dijelova – plemki s pupovima u podlogu. Prije nego što se započne sezona cijepljenja nužno je napraviti plan načina i vremena cijepljenja, te nabavku plemki kako bi se izbjeglo trošenje vremena ili suvišna, odnosno nedovoljna berba plemki. Nužno je unijeti sorte i klonove koji će se i u koje vrijeme, te u kolikom broju cijepiti. Također je potrebno pripremiti sav potreban pribor i pomoćni materijal za cijepljenje te uskladiti organizaciju rada.

Načini cijepljenja ovise o cilju, godišnjem dobu i vrsti podloge. Cijepljenje podloge *Poncirus trifoliata* provodi se u vrijeme kada ima dovoljno sokova, odnosno kada se bez teškoća može odvojiti kora od drveta. Najčešće je to u slobodnoj prirodi u proljeće i jesen kada ima dovoljno zrelih pupova – plemki za navrtanje. U zatvorenim prostorima (staklenici i plastenici), cijepljenje je moguće tijekom cijelog vegetacijskog perioda, jer su klimatski i zemljišni uvjeti optimalni (Bakarić, 1983.).

1.3.1. Okuliranje

Okuliranje na podlozi *Poncirus trifoliata* najuspješnije je u jesen ili proljeće. Jedan od najčešćih i najuspješnijih okuliranja u nas je okuliranje u obliku slova „T“. U tom se procesu cijepljenja na podlozi rasiječe kora u obliku slova „T“ i u uzdužni procijep unose pod koru pup s kratkim dijelom peteljke lista. Ako je došlo do uspješnog prijema pupa, peteljka požuti i uz lagani dodir opada nakon 8 – 10 dana. Ukoliko prijem nije bio uspješan, peteljka se zajedno s pupom osuši dobivajući tamno – smeđu boju. Može se dogoditi da peteljka nakon laganog dodira opadne, a pup još neko vrijeme ostane zelen, da bi se poslije toga posve osušio. Ukoliko se utvrdi da se pup počeo sušiti ili se već osušio, odmah se ponavlja okuliranje na suprotnoj strani. Strana svijeta na kojoj se okulira nije od posebne važnosti. Prevladava običaj da se okuliranje obavlja s južne strane.

Kada se okuliranje obavlja u proljeće (travanj – svibanj) na tjerajući pup, tada se odsijecanje dijela krošnje podloge izvodi 10 – 15 dana nakon okuliranja. Prilikom jesenskog okuliranja (kraj kolovoza i početak rujna) na spavajući pup, ova se radnja obavlja u proljeće, kojeg karakterizira početak kretanja vegetacije. Ostavlja se 10 – 12 cm podloge iznad primljenog pupa, koji služi za vezivanje i uspravljanje mladog izbojka –

okulanta. Popuštanje veza kojima je pup bio pričvršćen za podlogu obavlja se nakon 10 – 15 dana poslije proljetnog okuliranja te 30 – 40 dana poslije jesenskog okuliranja. Kao vez koristi se plastična traka – polietilenska ili polivilinska vrpca širine 1 cm, a debljine 0,1 mm. Okuliranje i drugi načini cijepjenja obavljaju se u ranim jutarnjim ili popodnevnim satima. Veliku ulogu u uspjehu okuliranja igra stanje i kvaliteta podloge. Najpovoljnija visina na kojoj se obavlja okuliranje je između šest i deset centimetara od razine tla. Sadnice na siromašnim tlima i visoko okulirane zaostaju u rastu i rodnosti (Bakarić, 1983.).

1.3.2. Cijepjenje na isječak

Ima prednosti što se može dulje vrijeme tijekom godine izvoditi i što nije potrebno puno soka u podlozi i plemci kao kod okuliranja u obliku slova „T“. Izvodi se tako što se na dijelu podloge učini kosi rez dužine tri centimetra kojim se zahvaća tanki dio drva, a ostavlja kosi isječak duljine 1 – 1,2 cm. Identičan rez napravi se na plemki s tankim dijelom drva i unosi na podlogu. Nužno je da su iste debljine plemka i podloga. Nakon toga se radi vezivanje s polietilenskom trakom. Daljnji proces rada jednak je kao i kod okuliranja (Bakarić, 1983.).

1.3.3. Cijepjenje sa strane pod koru

U Japanu se tradicionalno mandarina Unšiu najčešće cijepi sa strane pod koru pravljenjem ureza na podlozi u obliku slova „T“, ili zasijecanjem u drvo. Obavlja se u proljeće prije kretanja vegetacije, ali u vrijeme kada se kora podloge lako odvaja od drva. Može se provoditi ili krajem ljeta kada se obavlja cijepjenje na slovo „T“. Cijepjene pod koru sa strane (postrano navrtanje) provodi se tako da se kora na podlozi rasiječe u obliku slova „T“. Na donjem dijelu plemke koso se odreže dužina oko 5 – 7 cm (plemka koja ima obično 2 – 4 pupa). Kada se plemka uvukla pod koru obavlja se vezivanje i premazivanje cijepilnim voskom. Ovaj način cijepjenja ima prednosti kao što su prvoklasne sadnice tijekom jedne vegetacijske sezone i to što se koristi veliki dio plemke. Kod nas se ovaj način cijepjenja u rano proljeće može provoditi samo u zatvorenim prostorima gdje su osigurani povoljni temperaturni uvjeti. Također cijepjenje sa strane nije najprikladnije ni krajem ljeta na otvorenim površinama, jer postoji mogućnost da u ekstremno hladnijim

godinama dođe do stradavanja plemki. Ovaj način je proširen u Japanu gdje su znatno povoljni mikroklimatski uvjeti i u toku zime (Bakarić, 1983.).

1.3.4. Cijepljenje na most

Cijepljenje na most započinje se tako što se koso u pravcu debla posadi 6 – 8 dobro razvijenih podloga. Najčešće se obavlja tijekom proljeća. Na kori debla napravi se rez u obliku obrnutog slova „T“ u koje se uvlači prekinuti vrh podloge, te se čvrsto veže i premaže cijepilnim voskom. Nužno je ne dozvoliti da se na podlozi razvijaju novi izbojci. Cijepljenjem na most moguće je starija stabla još dugo čuvati i koristiti.

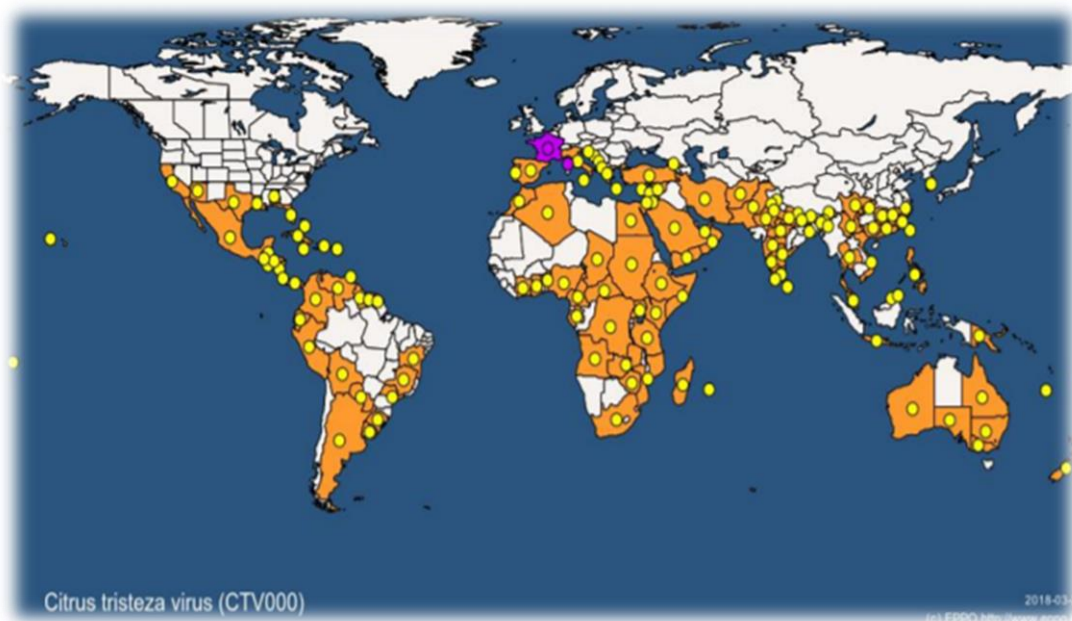
U proizvodnji sadnica kod nas mogu se koristiti svi opisani načini cijepljenja. Međutim, koji će se od načina koristiti ovisi o sposobnosti i navikama proizvođača. Kako bi se dobilo što više kvalitetnih sadnica trebali bi se koristiti svi načini cijepljenja (Bakarić, 1983.).

1.4. Virus tristeza (CTV virus) i simptomatologija

Virus CTV inficira sve vrste, sorte i hibride agruma (Dolja i sur., 2006.). Replicira se u stanicama floema (Dawson i sur. 2015). S obzirom da se CTV ne prenosi sjemenom, domaćinske biljke koje rastu na vlastitom korijenu, tj. sjemenjaci, uglavnom ne pokazuju simptome infekcije (Moreno i sur., 2008.). Rasprostranjenost virusa CTV u prirodi je posredovana vektorima kukcima/lisnim ušima, dok je širenje infekcije na velike udaljenosti uglavnom posljedica dva faktora, razvoja transporta brodovima i cijepljenja inficiranog sadnog materijala na podlogu zbog osjetljivosti komercijalnih sorti citrusa na gljivicu *Phytophthora* (Bar-Joseph i sur., 1979a., Moreno i sur., 2008.). S početka XIX stoljeća, prijenos čitavih biljaka, od kojih su neke bili asimptomatski nosioci virusa iz područja podrijetla komercijalnih sorti agruma, doveo je do širenja virusa CTV (Dawson i sur., 2015., Roistacher, 1981.). Bolest tristeza počinje se bilježiti s početkom komercijalne proizvodnje agruma, kada se radi povećanja produktivnosti i ublažavanja simptoma infekcija gljivičnim patogenima, agrumi cijepe. Prve epidemija zabilježena je 1930. godine u Argentini, 1937. godine u Brazilu, zbog čega je bolest dobila ime tristeza, što na portugalskom znači tuga (Moreno i sur., 2008., Bar-Joseph i sur., 1979b.). Ova bolest ne ubija drveće, ali dovodi do kržljanja i smanjenog prinosa kultivara na svim podlogama

(Dawson i sur., 2015.). S virusom CTV povezuje se i sindrom žutice sjemenjaka (seedling yellows) koji se javlja kod sadnica gorke naranče, grejpfruta i limuna (McClellan i Van der Plank, 1955.). Smatra se da je danas svako uzgojno područje agruma u svijetu potencijalno ozbiljno ugroženo bolešću tristeza.

U Europi je prisutnost virusa CTV najznačajnija na području Mediterana (Bar-Joseph i sur., 1983.). Virus je detektiran u Turskoj, Španjolskoj, Izraelu, Francuskoj i drugim uzgojnim područjima (Slika 3.). CTV je u Hrvatskoj prvi put dokazan 1986. godine u plemkama mandarine Unšiu - *C. unshiu* (Davino i Catara, 1986.), komercijalno najinteresantnije vrste u našim uzgojnim uvjetima. Serološke analize provedene 1990. godine potvrdile su visoku učestalost inficiranosti stabala iz matičnog nasada agruma (Šarić i Dulić, 1990.). Većina agruma u Hrvatskoj je cijepljena na podlogu *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., zbog čega je infekcija uglavnom asimptomatska, pa se virus nesmetano rasprostranjivao u sva uzgojna područja južne i srednje Dalmacije razmjennom i cijepljenjem inficiranog materijala (Černi 2009.). Uvjeti koji su bili prisutni na našem području (pojava smeđe uši agruma, blagi CTV genotipovi, cijepljenje na podloge koje su osjetljive na infekciju, potencijalno velika varijabilnost hrvatskih CTV izolata) pogodovali su rasprostranjivanju virusa i procjena je da bi virusne varijante prisutne na našim prostorima mogle predstavljati ozbiljnu prijetnju nasadima agruma u mediteranskim zemljama.



Slika 3. Geografska distribucija virusa CTV

(Izvor: <https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/distribution>).

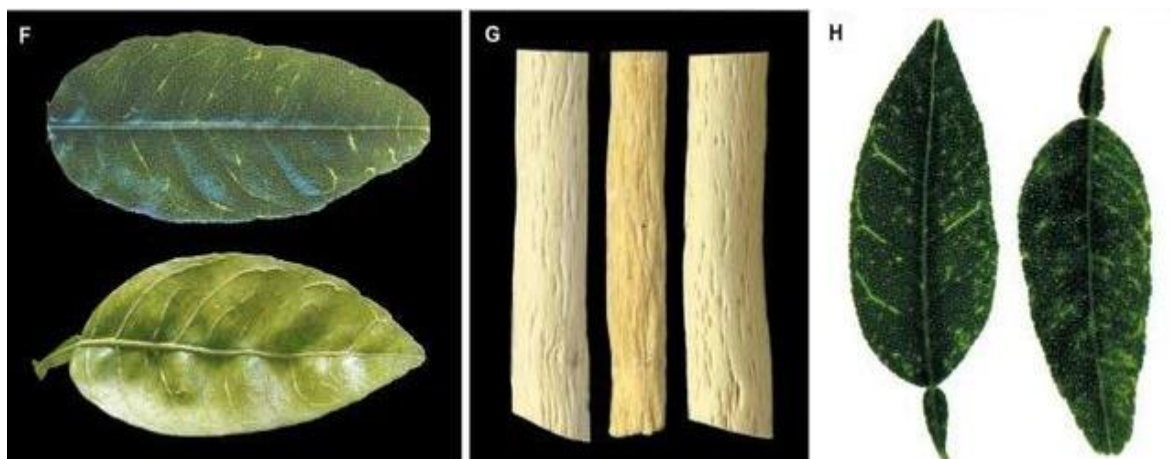
Sindrom brzog propadanja i smrti stabala (bolest tristeza u užem smislu), rezultira brzim propadanjem i smrću brojnih komercijalno značajnih vrsta agruma. Zaraženo drvo pokazuje gubitak korijenske mase, zaustavljanje ili slab rast, odumiranje, klorozu listova, smanjenu veličinu ploda, gubitak listova, simptome deficita minerala i na kraju propada. izraženiji je kod starijih stabala, dok mlađe biljke obično ostaju slabo razvijene (Slika 4., A i B). Kod mladih agruma obično se javlja žutica sjemenjaka, generalno u visokom postotku u staklenicima i kod vršno cijepljenih biljaka na terenu (Harper i sur., 2014., Wallace i Drake, 1972.). Poslije nekoliko mjeseci, drveće s manje teškim simptomima može nastaviti normalan rast.



Slika 4. Sindrom brzog propadanja i smrti stabala (Izvor: <https://www.researchgate.net/>)

Kod jamičavosti (Slika 5., G) uzrokovano virusom CTV, ispod izoliranih, ulegnutih područja kore, jamičavost uzrokuje razvoj dubokih jamica u drvu biljke, što kronično ograničava rast i razvoj agruma, izaziva značajnu redukciju snage biljke, izražen je patuljasti rast i nizak prinos plodova neadekvatnih za tržište. Jamičavošću izazvan neprofitabilan rast različitih komercijalnih sorti agruma obično ne uzrokuje smrt stabla, već velike ekonomske gubitke (Dawson i sur., 2015., Harper i sur., 2014.).

Prosvjetljenje lisne nervature povremeno se može vidjeti na poljima, ali je česta karakteristika na koju se nailazi tijekom bioloških analiza CTV izolata u staklenicima (Dawson i sur., 2015.). Intenzitet simptoma je veći kod mladih listova i smanjuje se kako ojačavaju. Intenzivno prosvjetljenje lisne nervature ponekad je praćeno oplutnjavanjem, smanjenjem veličine lista i žuticom cijelog lista (Slika 5., F i H).



Slika 5. Simptomi jamičavosti i prosvjetljenje lisne nervature

(Izvor: <https://www.researchgate.net/>)

1.5. Mikropropagacija agruma – kultura tkiva *in vitro*

Razmnožavanja podloga za agrume u rasadnicima većinom je bazirano na proizvodnji nucelarnih biljaka. Posljednjih 20 godina dosta se pažnje pridodaje mogućnosti razmnožavanja pojedinih podloga pomoću reznica. Mikropropagacija je u pojedinim zemljama svijeta postala uobičajena metoda jer pruža potencijal u masovnoj proizvodnji uz prevladavanje nedostataka nucelnog razmnožavanja.

Agrumi predstavljaju jednu od važnih skupina voća diljem svijeta, a razmnožavaju se vrlo teško. Vegetativno razmnožavanje citrusa danas se uglavnom izvodi cijepljenjem pupova na određenu podlogu. Uslijed velikih gubitaka zbog Phytophthore, virusa tristeza (CTV), povećao se interes oplemenjivača u iznalaženju rezistentnih podloga za citrusa. Potencijal konvencionalnih metoda u oplemenjivačkom programu limitiran je fiziološkim čimbenicima kao što je heterozigotnost, inbreeding, nucelarna poliembrionija i juvenilnost. U takvim uvjetima napredna tehnika kulture tkiva *in vitro* pruža alternativu za masovnu proizvodnju rezistentnih potomaka elitnih genotipova podloga za agrume.

Mikropropagacija podloga agruma je zahtjevna, a uspjeh ovisi o nekoliko čimbenika: genotip, starost eksplantata, hranjiva podloga i koncentracija biljnih regulatora rasta koji utječu na sposobnost regeneracije.

Najbolji rezultati proliferacije uglavnom se postižu korištenjem početnog eksplantata (inicijalni, bazni materijal) s biljke u juvenilnoj fazi. Većina protokola *in vitro* organogeneze pojedinih podloga za agrume razvijeno je iz epikotila ili nodijalnih

segmenata nastalih upravo s juvenilnih eksplantata (Molina i sur., 2007.; Tong i sur., 2009.; Germanà i sur., 2011.; Marques i sur., 2011.).

Eksplantati u mikropropagaciji agruma su najčešće: nodijalni segmenti (Kumar i sur., 2014.), aksilarni izdanci (Tallón i sur., 2012.), vrh izdanka (Sharma i sur., 2009.), zreli pupoljak stabljike (Kanwar i sur., 2013.), dijelovi korijena (Sim i sur., 1989.) i lista (Yelenosky, 1987.). Rezultati uspješnosti pojedinih tipova eksplantata variraju ovisno o genotipu.

Fitohormoni ili biljni regulatori rasta imaju vrlo važnu ulogu u regeneraciji, multiplikaciji i rizogenezi biljaka *in vitro*. Citokinini kao što su BAP, Kinetin, TDZ, 2iP, najčešće se koriste u fazi multiplikacije i indukcije izdanaka, dok se u indukciji rizogeneze koriste auksini NAA, IBA, IAA i 2.4-D. BAP je vrlo stabilan i jeftin citokinin te se najčešće upotrebljava u *in vitro* organogenezi podloga za agrume (Costa i sur., 2004.; Germanà i sur., 2008.). Optimalna koncentracija također varira ovisno o genotipu.

Benefiti bilo koje metode mikropropagacije mogu biti potpuno realizirani uspješnim transferom biljaka iz *in vitro* u *ex vitro* okolišne uvjete. Sterilni supstrat i uvjeti visoke vlage unutar staklenika s temperaturom 25 – 27 °C uspješni su u aklimatizaciji (Starrantino i Caruso, 1987.). Murkute i sur., (2008.) iznose uspješnu aklimatizaciju na kokosovim vlaknima, Sen i Dhawan, (2008.) na mješavini supstrata i agropa, a Sharma i sur., (2009.) supstrata i pijeska.

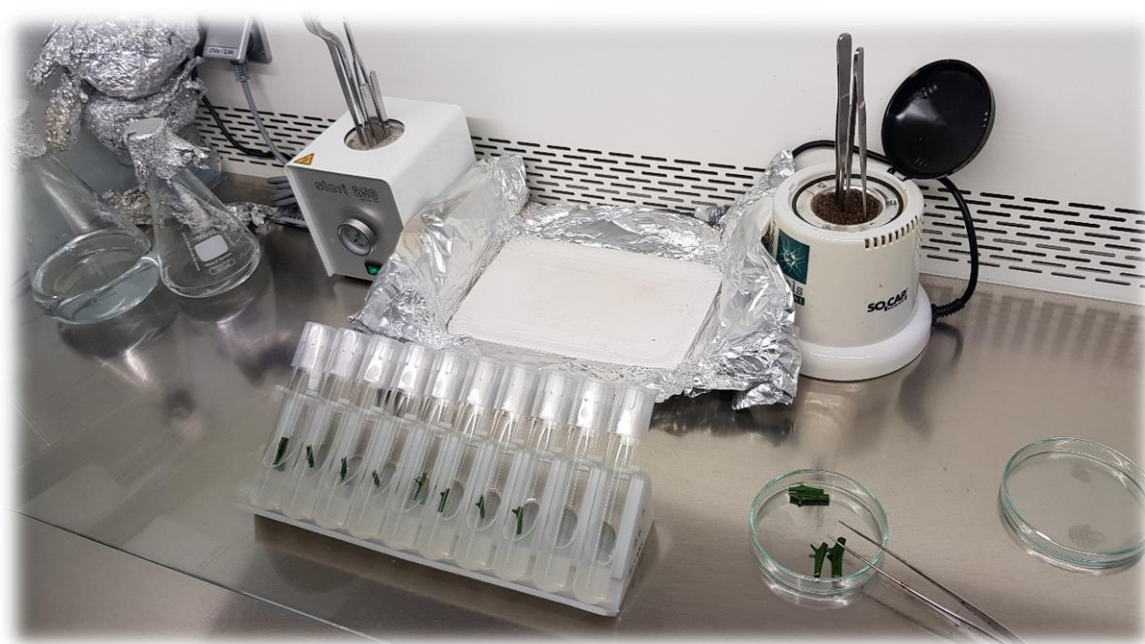
Iz iznesenih podataka vidljiv je napredak u *in vitro* razmnožavanju podloga za agrume. Međutim, potrebno je iznaći preinake u cilju smanjenja troškova proizvodnje i rizika u varijabilnosti proizvedenih biljaka. Ekonomska analiza i/ili benefiti biljaka nastalih mikropropagacijom u literaturi nisu poznati. Procjenjuje se da faza ukorjenjivanja *in vitro* čini 35 do 75 % ukupnih troškova mikropropagacije. Stoga je potrebno dati prednost onim sustavima koji koriste jedan, odnosno istodobnu fazu rizogeneze i aklimatizacije koje bi znatno smanjilo troškove mikropropagacije. Ovakva rješenja leže u korištenju suvremenih imerznih bioreaktora (TIB sustavi) nove generacije koji su trenutno vrlo aktualna istraživačka tematika diljem svijeta.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Opis laboratorija i cilj istraživanja

Istraživanje u cilju mikropropagacije vegetativne podloge agruma *Poncirus trifoliata* Raf. provedeno je u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS) tijekom 2020. godine.

U laboratorija se vrše mnoga *in vitro* istraživanja na raznim voćnim vrstama (malina, orah, borovnica, paulovnja, lijeska, vegetativne podloge za trešnju, višnja, goji, itd.). Katedra se bavi razvijanjem i poboljšanjem protokola u cilju razvoja oplemenjivačkog i selekcijskog rada u voćarstvu, edukacijom studenata, proizvodnjom sadnog materijala i sekundarnih metabolita. Laboratorij posjeduje svu opremu potrebnu za uspješno provođenje mikropropagacije (laminarni stol/kabinet – slika 6., autoklav, miješalica, pH metar, sterilizator, pincete, skalpeli, teglice, TIB SETIS® sustav bioreaktora, itd.), matični biljni materijal (matičnjak – prijavljen u centru za rasadničarstvo HAPIH), prostor za aklimatizaciju i klima komoru s kontroliranim uvjetima potrebnim za razvoj biljaka u pojedinim fazama mikropropagacije.



Slika 6. Laminarni kabinet - aseptični uvjeti, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

2.2. Postavljanje istraživanja, sterilizacija i tretmani u pokusu

S matičnih biljaka *Poncirus trifoliata* Raf. koje se nalaze u atriju Fakulteta (Slika 7.) uzete su grančice koje su prenesene u laboratorij na daljnju disekciju i sterilizaciju.



Slika 7. Matičnjak voćnih vrsta, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

U laboratoriju je izvršena disekcija grančica na nodijalne segmente s aksilarnim pupom veličine oko 2 cm (Slika 8.), nakon čega je uslijedilo uspostavljanje aseptične kulture.



Slika 8. Disekcija nodijalnih eksplantata, FAZOS (Izvor: Horvat, 2020.)

Sterilizacija biljnog materijala obavila se prema sljedećem protokolu:

- ✓ ispiranje eksplantata 10 minuta pod tekućom vodom
- ✓ uranjanje eksplantata u mješavinu antibiotika kasugamicin 1 ml/l + amoksicilin 0.1 g/l kroz 15 minuta (magnetna miješalica)
- ✓ uranjanje eksplantata u mješavinu fungicida fosetil/folpet 3 g/l + kaptan 3 g/l kroz 15 minuta (magnetna miješalica)
- ✓ uranjanje eksplantata u Previcur 5% kroz 30 minuta (magnetna miješalica)
- ✓ uranjanje eksplantata u etanol 70% na jednu minutu
- ✓ uranjanje eksplantata u NaOCl (10% cekina) + Tween 80 (2 kapi) kroz 15 minuta (magnetna miješalica)
- ✓ ispiranje u tri sterilne vode (sterilni uvjeti laminarne komore)
- ✓ uvođenje (inicijacija) u sterilne epruvete s hranjivim medijem (sterilni uvjeti laminarne komore)

U istraživanju je korištena hranjiva podloga MS (Murashige i Skoog, 1962.) proizvođača Duchefa Biochemie B.V., Nizozemska. Detaljan sastav hranjive podloge u istraživanju nalazi se u tablici 1.

Tablica 1. Sastav hranjive podloge MS, (Izvor: Duchefa catalogue, 2010-2012.)

| MICRO ELEMENTS | | |
|--|---------|--------|
| | mg/l | µM |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 | 0.11 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.025 | 0.10 |
| FeNaEDTA | 36.70 | 100.00 |
| H ₃ BO ₃ | 6.20 | 100.27 |
| KI | 0.83 | 5.00 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 16.90 | 100.00 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 | 1.03 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8.60 | 29.91 |
| MACRO ELEMENTS | | |
| | mg/l | mM |
| CaCl ₂ | 332.02 | 2.99 |
| KH ₂ PO ₄ | 170.00 | 1.25 |
| KNO ₃ | 1900.00 | 18.79 |
| MgSO ₄ | 180.54 | 1.50 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650.00 | 20.61 |
| Total concentration Micro and Macro elements: 4302.09 mg/l | | |
| VITAMINS | | |
| | mg/l | µM |
| Glycine | 2.00 | 26.64 |
| myo-Inositol | 100.00 | 554.94 |
| Nicotinic acid | 0.50 | 4.06 |
| Pyridoxine HCl | 0.50 | 2.43 |
| Thiamine HCl | 0.10 | 0.30 |

Svi tretmani obuhvaćali su podjednaku koncentraciju učvršćivača agara (6.3 g/l), a pH vrijednost medija prije autoklaviranja je podešena na 5.8.

Tretmani (T) su se razlikovali po vrsti i koncentraciji dodanih biljnih hormona:

- T1 = MS + 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA
- T2 = MS + 1 mg/l Zeatin
- T3 = MS + 0.5 GA₃

Svaka epruveta sadržavala je 10 ml hranjivog medija, a svaki tretman uključivao je 10 eksplantata (ukupno 30 eksplantata/epruveta). Svi tretmani su autoklavirani na 120 °C, kroz 20 min. pri tlaku od 1.2 bara. Nakon inicijacije eksplantata u sterilnim uvjetima laminarne komore (Slika 9.), svi tretmani (epruvete) postavljeni su u kontrolirane uvjete klima komore na režim svjetlosti 16/8 i temperaturu od 24 °C kroz 30 dana.



Slika 9. Inicijacija eksplantata u pokusu, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

2.3. Mjerenja u istraživanju

Nakon 30 dana kulture pristupilo se mjerenju učinkovitosti pojedinih tretmana (biljnih hormona) na uspješnost proliferacije (organogeneze), mjerena je stopa kontaminacije i testirana najidealnija kombinacije u daljnjoj fazi - multiplikaciji.

3. REZULTATI I RASPRAVA

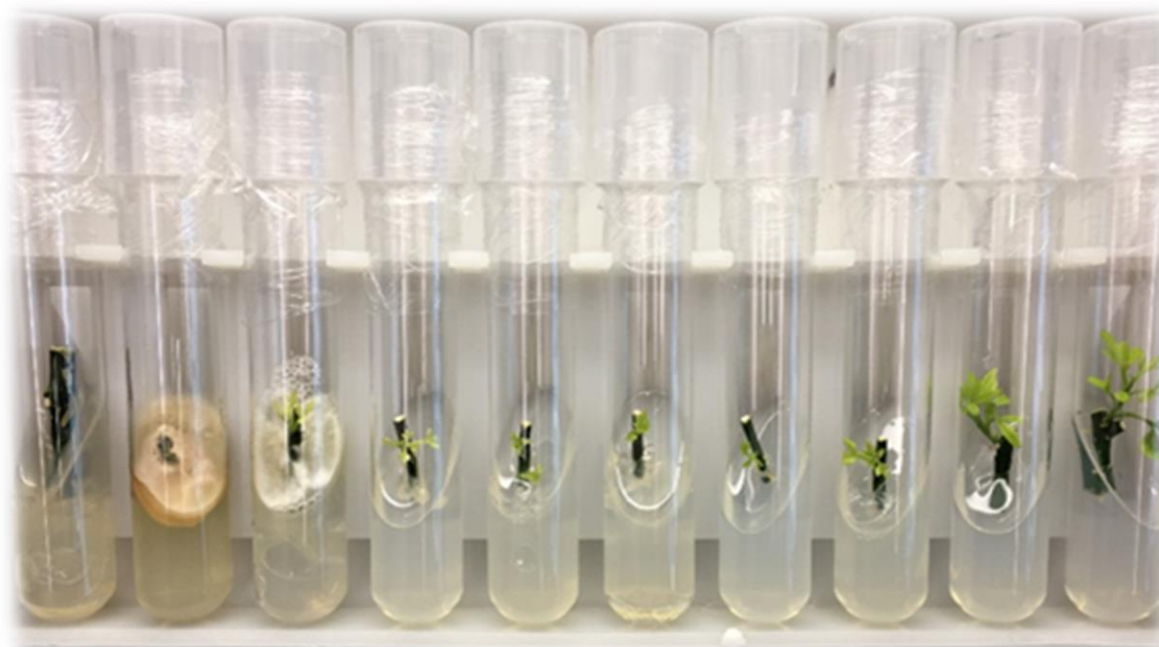
3.1. Učinkovitost tretmana u proliferaciji (organogeneza) nakon 15 dana

Nakon 15 dana kulture pristupilo se mjerenju stope proliferacije, jake proliferacije i kontaminacije po pojedinim tretmanima (Tablica 2.).

Tablica 2. Rezultati uspješnosti proliferacije nakon 15 dana kulture

| | T1 (BAP + IBA) | T2 (Zeatin) | T3 (GA ₃) |
|---------------------------|----------------|-------------|-----------------------|
| <i>Proliferacija</i> | 90 % | 80 % | 50 % |
| <i>Kontaminacija</i> | 30 % | 50 % | 10 % |
| <i>Jaka proliferacija</i> | 30 % | 10 % | 0 % |

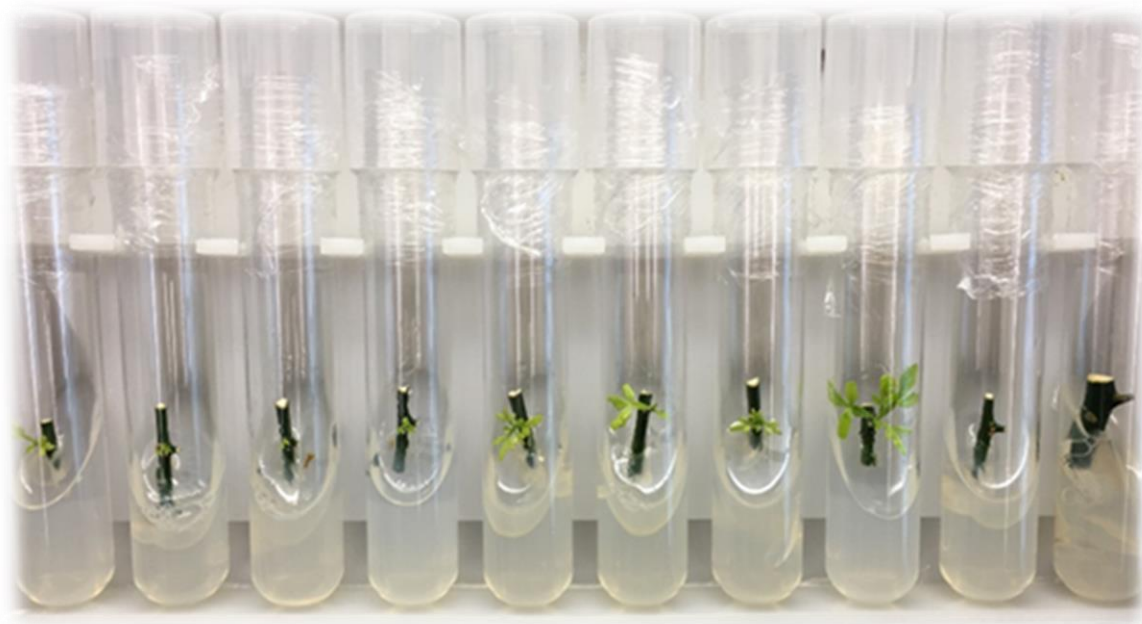
Iz tablice 2. i slike 10. vidljivo je da je T1 (BAP + IBA) rezultirao najvećom stopom proliferacije od 90 %, a vrlo jaka proliferacija zabilježena je na 30 % eksplantata. Kontaminacija je zabilježena također na 30 % eksplantata.



Slika 10. Organogeneza eksplantata - tretman T1 (BAP+IBA), FAZOS

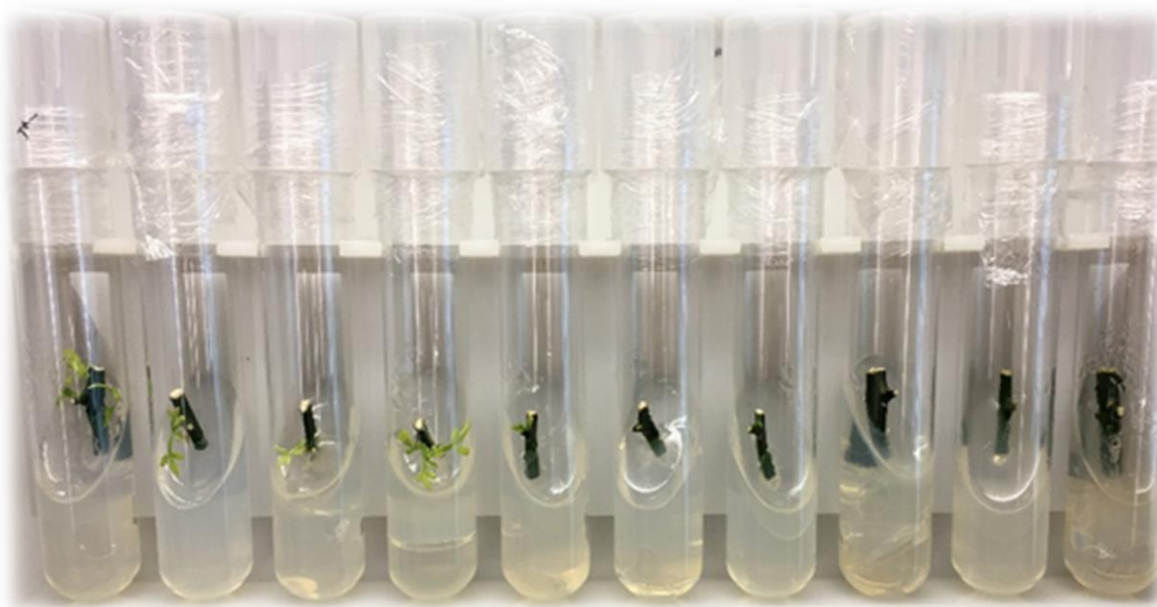
(Izvor: Horvat, 2020.)

Tretman T2 (Zeatin) inicirao je proliferaciju na 80 % eksplantata, a samo na jednom (10 %) vrlo jaku proliferaciju. Kontaminacija je iznosila 50 % (Tablica 2., Slika 11.).



Slika 11. Organogeneza eksplantata - tretman T2 (Zeatin), FAZOS (Izvor: Horvat, 2020.)

Tretman koji je uključivao GA_3 (T3) uspio je inicirati proliferaciju na 50 % eksplantata, s najmanjom kontaminacijom od svega 10 % (jedan eksplantat). Na tretmanu T3 nije zapažena jaka proliferacija eksplantata (Tablica 2, Slika 12.).



Slika 12. Organogeneza eksplantata - tretman T3 (GA_3), FAZOS (Izvor: Horvat, 2020.)

3.2. Učinkovitost tretmana u proliferaciji (organogeneza) nakon 30 dana

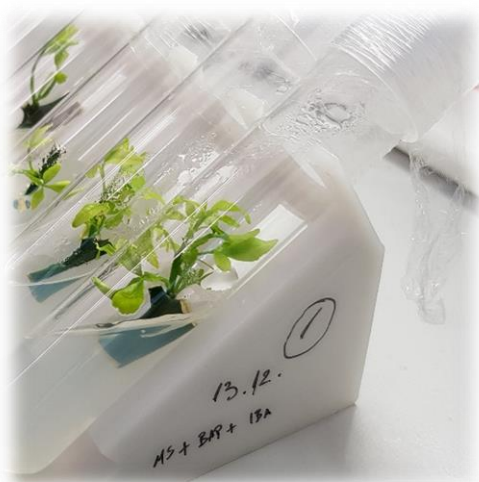
Nakon 30 dana pristupilo se završnom mjerenju učinkovitosti pojedinih tretmana u organogenezi eksplantata. U narednih 15 dana došlo je do odumiranja pojedinih eksplantata uslijed kontaminacije ili drugih stresnih uvjeta (medij, hormoni, okolišni uvjeti, itd.) tijekom kulture.

Tablica 3. Rezultati uspješnosti proliferacije nakon 30 dana kulture

| | T1 (BAP + IBA) | T2 (Zeatin) | T3 (GA3) |
|----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|
| <i>Kontaminacija</i> | 70 % | 80 % | 90 % |
| <i>Živo</i> | 70 % | 20 % | 10 % |
| <i>Neživo</i> | 30 % | 80 % | 90 % |
| <i>Zdravo</i> | 30 % | 20 % | 10 % |

Prema tablici 3. najbolji rezultati zabilježeni su na tretmanu T1 koji je uključivao kombinaciju citokinina BAP i auksina IBA (Slika 13.). Na ovom tretmanu zabilježena je najmanja stopa kontaminacije od 70 % i stopa odumrlih eksplantata od samo 30 %. Uspješnost tretmana iznosi 30 %, odnosno na kraju ciklusa imali smo 3 zdrava eksplantata s dovoljno inicirane biomase (izdanaka) za daljnu multiplikaciju.

Ostala dva tretmana (T2 i T3) uspjeli su također inicirati jedan (10 % - T3) i dva (20 % - T2) zdrava eksplantata sposobna za daljnju multiplikaciju. Na žalost na oba tretmana zabilježena je velika smrtnost eksplantata nakon 30 dana kulture (T2 – 80 % i T3 – 90 %) pretpostavljamo uslijed visoke stope kontaminacije.



Slika 13. Zdravi eksplantati - T1 tretman nakon 30 dana, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

3.3. Multiplikacija eksplantata

Inicirani i zdravi eksplantati tretmana T1 uključeni su u daljnju fazu multiplikacije na istoj podlozi i s istim koncentracijama hormona – BAP i IBA (Slika 14.).



Slika 14. Eksplantati tretmana T1 uključeni u daljnju fazu multiplikacije, FAZOS
(Izvor: Bošnjak, 2020.)

Nakon 30 dana kulture svi eksplantati inicirali su dovoljno biomase potrebne za daljnju multiplikaciju ili fazu rizogeneze. Multiplikacija je iznosila 3.7, odnosno od jednog eksplantata nakon 30 dana kulture nastala su 4 nova eksplantata. Nakon nekoliko uspješnih ciklusa multiplikacije stvoren je zavidan broj novih biljaka na kojim će se obavljati druga tematska istraživanja (Slika 15.).



Slika 15. *In vitro* kultura *Poncirus trifoliata* Raf., FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

3. ZAKLJUČAK

Na osnovi iznesenih rezultata istraživanja, možemo zaključiti sljedeće:

- U rasadničkoj proizvodnji važnu ulogu ima kontinuirano uvođenje suvremenih *in vitro* metoda klonskog razmnožavanja reprodukcijanskog materijala.
- *Poncirus trifoliata* Raf. je najzastupljenija i najvažnija podloga mandarine Unšiu u Hrvatskoj i drugim proizvodnim zemljama svijeta.
- Tretman T1 koji je uključivao kombinaciju citokinina BAP (1mg/l) i auksina IBA (0.1 mg/l) rezultirao je najvećom stopom proliferacije nakon 15 dana (90 %), vrlo jaka proliferacija zabilježena je na 30 % eksplantata.
- U narednih 15 dana (kraj ciklusa) došlo je do odumiranja pojedinih eksplantata uslijed kontaminacije ili drugih stresnih uvjeta tijekom kulture (T3 – 90% kontaminacija).
- Nakon 30 dana kulture na tretmanu (T1) zabilježena je najmanja stopa kontaminacije (70 %) i najmanje odumrlih eksplantata (30 %).
- Zdravi eksplantati T1 tretmana uključeni su u daljnju fazu multiplikacije.
- Nakon nekoliko uspješnih ciklusa multiplikacije dobiven je dovoljan broj novih zdravih biljaka na kojim će se obavljati brojna druga istraživanja.
- Kombinacija citokinina BAP i auksina IBA sa sigurnošću možemo reći da je vrlo učinkovita u organogenezi nodijalnih eksplantata, odnosno daljnjoj *in vitro* multiplikaciji vegetativne podloge agruma *Poncirus trifoliata* Raf.

4. POPIS LITERATURE

1. Bakarić, P. (1983.): Uzgoj mandarine Unšiu, Stanica za južne kulture, Dubrovnik, str.56-60, 69-81.
2. Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D. (1979a.): The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses, *Adv Virus Res*, 25: 93-168.
3. Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.E., (1979b.): The use of enzymelinked immunosorbent assay for detection of Citrus tristeza virus, *Phytopathology*, 69:190–94.
4. Bar-Joseph, M., Roistacher, C.N., Garnsey, S.M. (1983.): The epidemiology and control of citrus tristeza disease, In: *Plant virus epidemiology* (Ed. by Plumb, R.T., Thresh, J.M.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp.61-72.
5. Costa, M.G.C., Alves, V.S., Lani, E.R.G., Mosquim, P.R., Carvalho, C.R., Otoni, W.C. (2004.): Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of Citrus, *Scientiae Horticulturae*, 100(1):63-74.
6. Černi, S. (2009.): Molekularna varijabilnost i populacijska struktura hrvatskih izolata virusa tristeza (Citrus tristeza virus), Doktorska disertacija, Biološki odsjek, Prirodoslovnomatematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
7. Davino, M., Catara, A. (1986.): La tristeza degli agrumi, *Informatore Fitopatologico*, 36: 9-18.
8. Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Moreno, P. (2015.): Citrus tristeza virus: Making an Ally from an Enemy, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 53:7.1–7.19.
9. Dolja, V.V., Kreuze, J.F., Valkonen, J.P.T. (2006.): Comparative and functional genomics of closteroviruses, *Virus Res.*, 117:38-517.
10. Duchefa Catalogue (2010-2012): *Plant Cell and Tissue Culture, Phytopathology, Biochemicals*, Duchefa Biochemie B.V., Netherlands.
11. Germana, M.A., Macaluso, L., Patricolo, G., Chiancone, B. (2008.): Morphogenic response in vitro of epicotyl segments of Citrus macrophylla, *Plant Biosystems*, 142(3):661-664.
12. Germana, M.A., Micheli, M., Chiancone, B., Macaluso, L., Standardi, A. (2011.): Organogenesis and encapsulation of in vitro-derived propagules of Carrizo citrange [Citrus sinensis (L.) Osb. × Poncirus trifoliata (L.) Raf], *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2):299-307.

13. Harper, S.J., Cowell, S.J., Robertson, C.J., Dawson, W.O. (2014.): Differential tropism in roots and shoots infected by Citrus tristeza virus, *Virology*, 460–461:91–99.
14. Kanwar, J., Godara, S., Kaul, M.K., Srivastava, A.K. (2013.): Micro propagation of carrizo (Citrus carrizo) through mature bud culture, *Agricultural Science Digest*, 33(2):109-113.
15. Kumar, R., Kaul, M.K., Saxena, S.N., Singh, A.K., Singh, J., Lohora, S.K. (2014.): In vitro propagation studies of virus tolerant citrus rootstock Cleopatra mandarin (Citrus reshni Tanaka), *Progressive Horticulture*, 46(2):202-208.
16. Marques, N.T., Nolasco, G.B., Leitão, J.P. (2011.): Factors affecting in vitro adventitious shoot formation on internode explants of Citrus aurantium L. cv. Brazilian, *Scientia Horticulturae*, 129(2):176-182.
17. McClean, A.P.D., Van der Plank, J.E. (1955.): The role of seedling yellows and stem pitting in tristeza of citrus, *Phytopathology*, 45:222–24.
18. Molina, R.V., Castello, S., García-Luis, A., Guardiola, J.L. (2007.): Light cytokinin interactions in shoot formation in epicotyl cuttings of Troyer citrange cultured in vitro, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(2,3):131-140.
19. Moreno, P., Ambrós, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., Peña, L. (2008.): Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry, *Mol Plant Pathol.*, 9(2):251-68.
20. Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
21. Murkute, A.A., Sharma, S., Singh, S.K. (2008.): Rapid clonal in vitro multiplication of Citrus jambhiri and Citrus karna, *Indian Journal of Horticulture*, 65(2):127-133.
22. Roistacher, C.N. (1981.): A blueprint for disaster. The history of seedling yellows disease, *Citrograph*, 67:4-24.
23. Starrantino, A., Caruso, A. (1987.): Experiences on the in vitro propagation of some citrus rootstocks, *Acta Horticulturae*, 212:471-478.
24. Sen, S., Dhawan, V. (2008.): Micropropagation of Troyer Citrange [Poncirus trifoliata (L.) Raf. × C. sinensis (L.) Osbeck], In: International Symposium on Biotechnology of Fruit Species, 839:63-70.
25. Sharma, S., Prakash, A., Ajinath, T. (2009.): In vitro propagation of Citrus rootstocks, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, Cluj-Napoca* 37(1):84-88.

26. Sim, G.E., Goh, C.J., Loh, C.S. (1989.): Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco-multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6-benzylaminopurine, *Plant Science*, 59(2):203-210.
27. Šarić, A., Dulić, I. (1990.): Detection and serological identification of CTV in citrus cultivars in the lower reaches of the Neretva river valley, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 55:171-176.
28. Tallón, C.I., Porras, I., Pérez-Tornero, O. (2012.): Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators, *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 48(5):488-499.
29. Tong, Z., Tan, B., Zhang, J., Hu, Z., Guo, W., Deng, X. (2009.): Using precocious trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) to establish a short juvenile transformation platform for citrus, *Scientia Horticulturae*, 119(3):335-338.
30. Wallace, J.M., Drake, R.J. (1972.): Studies on recovery of citrus plants from seedling yellows and the resulting protection against reinfection, *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.*, 5:127-36.
31. Yelenosky, G. (1987.): Shoot organogenesis from rooted citrus leaves, *Hort Science.*, 22(2).