

# Primjena kelatizirajućih spojeva sa željezom u mikropropagaciji borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.)

---

Đorđić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

*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:151:058965>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**



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

Nikolina Đorđić

Diplomski sveučilišni studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**PRIMJENA KELATIZIRAJUĆIH SPOJEVA SA ŽELJEZOM U  
MIKROPROPAGACIJI BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L. )**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Nikolina Đorđić

Diplomski sveučilišni studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**PRIMJENA KELATIZIRAJUĆIH SPOJEVA SA ŽELJEZOM U  
MIKROPROPAGACIJI BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L. )**

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

**Osijek, 2021.**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	3
2.1. Povijest, porijeklo i benefiti borovnice.....	3
2.2. Proizvodnja borovnice u Hrvatskoj .....	6
2.3. Razmnožavanje borovnice .....	8
2.3.1. Mikropropagacija, kultura tkiva in vitro .....	9
2.4. Željezo u mineralnoj ishrani biljaka .....	11
2.4.1. FeNaEDTA u kulturi tkiva .....	12
2.4.2. FeEDDHA u kulturi tkiva.....	13
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	17
3.1. Opis laboratorija i cilj istraživanja.....	17
3.2. Postavljanje pokusa i tretmani u istraživanju.....	18
3.3. Mjerenja u istraživanju i obrada podataka.....	20
<b>4. REZULTATI</b> .....	22
4.1. Rezultati na razini cijelog pokusa.....	22
4.2. Razlike između tretmana po kultivarima .....	23
<b>5. RASPRAVA</b> .....	24
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	29
<b>7. POPIS LITERATURE</b> .....	30
<b>8. SAŽETAK</b> .....	33
<b>9. SUMMARY</b> .....	34
<b>10. POPIS TABLICA</b> .....	35
<b>11. POPIS SLIKA</b> .....	36
<b>12. POPIS GRAFIKONA</b> .....	37
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b>	
<b>BASIC DOCUMENTACION CARD</b>	

## 1. UVOD

Posljednjih godina borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) u RH bilježi blago povećanje broja proizvođača, a samim time i površina pod ovom voćnom kulturom. Navedena situacija pripisuje se programima mjera ruralnog razvoja, ali i dosta dobroj otkupnoj cijeni koju borovnica postiže na tržištu. Svjedoci smo i učestalog marketinga (TV reklame, oglasi, članci, itd.) koji borovnicu apostrofira kao funkcionalnu hranu „supervoće“ bogatu bioaktivnim prirodnim tvarima koje utječu na očuvanje i zaštitu ljudskog zdravlja. Sve navedeno predstavlja dovoljan razlog budućim mladim proizvođačima da se okrenu upravo ovakvim voćnim kulturama. Intenzivna rasadničarska proizvodnja borovnice u RH ne postoji te je ona uglavnom bazirana na uvozu deklariranog sadnog materijala iz renomiranih rasadnika susjednih država članica EU (Italija, Francuska, Mađarska, itd.). Uvezeni sadni materijal većinom je nastao iz laboratorija, odnosno biotehnoškim procesom kulture tkiva *in vitro* (mikropropagacijom).

U RH zastupljenost takvih specijaliziranih i akreditiranih *in vitro* laboratorija vrlo je mala te se može nabrojati na prste jedne ruke. Kultura tkiva *in vitro* (mikropropagacija) osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog sadnog materijala u kratkom vremenskom intervalu.

Razmnožavanje borovnice kulturom tkiva *in vitro* – mikropropagacijom se rutinski provodi u mnogim istraživanjima. Poznato je da koeficijent razmnožavanja biljaka u kulturi *in vitro* ovisi o genotipu, sastavu hranjive podloge, uvjetima uzgoja, itd. Jedna od najvažnijih komponenti hranjive podloge je i željezo (Fe) koje sudjeluje u mnogim procesima u biljci. Izuzetno je važno u biosintezi klorofila, a nedostatak ograničava rast biljaka i uzrokuje klorozu. Željezo se unutar medija najčešće koristi u kelatiziranom obliku Fe-EDTA (željezo-etilendiamintetraoctena kiselina). Pregledom recentne literature, mnogi istraživači naglašavaju kako supstitucija Fe-EDTA s Fe-EDDHA (etilendiamin di-2-hidroksi-fenil-acetat-ferit) u mediju povećava dostupnost željeza i razinu klorofila u listovima mnogih voćnih kultura.

Iz navedenih razloga krenulo se u postavljanje pokusa i pisanja ovog diplomskog rada. Istraživanje je provedeno na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* - laboratorij za voćarstvo). Cilj ovog istraživanja (diplomskog rada) usmjeren je na ispitivanje utjecaja modifikacije hranjivog

medija primjenom kelatizirajućih spojeva željeza na rast i razvoj (morfološke parametre) borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Povijest, porijeklo i benefiti borovnice

Povijest uzgoja i konzumacije borovnice seže u prošlost američkih domorodaca (Slika 1.). Oni su ju konzumirali svježu ili sušili te čuvali za zimu. Od listova, cvjetova i rizoma pravili su čaj prelijevanjem biljne materije vrućom vodom. Čaj su koristili u liječenju želučanih grčeva kod novorođene djece, za poticanje poroda te kao diuretik.



**Slika 1.** Indijanke u berbi borovnice (Izvor: <https://oregonaitc.org>)

Postoji između 150 i 450 vrsta zimzelenih i listopadnih grmova koji po sistematskoj klasifikaciji svrstavamo u rod *Vaccinium* koji pripada porodici *Ericaceae* (vrjesovke). Njih karakterizira široka geografska rasprostranjenost. Nalazimo ih počevši od sjeverne hemisfere pa sve do planina tropske Azije te do Srednje i Južne Amerike. Zbog potrebe za razdobljem dormantnosti kako bi završile svoj razvojni ciklus ove vrste najraširenije su na području sjeverne hemisfere. Karakteristično za vrste iz porodice *Ericaceae* pa tako i rod *Vaccinium* je da najbolje uspijevaju na tlu koje je dobro drenirano i sadrži dosta organske tvari (od 3 do 15 %). Najvažnije svojstvo tla koje diktira uspješnost uzgoja je dakako pH vrijednost. *Vaccinium* vrste najbolje rastu u kiseloj sredini čija se pH vrijednost kreće između 4,0 i 5,2 (Griffin i Blazich, 2008.). Promjenom pH vrijednosti dolazi do pojave simptoma nedostatka nekog od elemenata ishrane.

Ovisno o vrsti grmova borovnice mogu biti visine od 0,3 do 5,0 metara. Visokogrmoliki kultivari su uglavnom hibridi koje dalje možemo podijeliti u sjeverne i južne tipove ovisno o njihovoj potrebi za hladnim, zimskim razdobljem (Griffin i Blazich, 2008.).

To je višegodišnja drvenasta biljka, razgranjenog korijena i stabljike. Listovi su joj cjeloviti, jajoliko duguljasti ili lancetasti, cjelovitog ruba, na naličju, a ponekad i cijelom površinom dlakavi. U jesen postaju grimizno crveni i tada imaju i dekorativnu funkciju. Bijeli cvjetovi su skupljeni u male grozdove koji cvatu u proljeće. Plod je tamnoplava mesnata boba s ostacima čaške na vrhu (Dujmović Purgar i sur., 2007.).



**Slika 2.** *Vaccinium corymbosum* L. – morfološke osobine (Izvor: <https://www.pinterest.se>)

Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) poznatija je i kao američka borovnica (Slika 2.) jer je upravo na američkom tlu, točnije u SAD-u još davne 1893. godine započeo uzgoj ove vrste. U Hrvatskoj je prvi put posađena 1964. Rod *Vaccinium* obuhvaća relativno velik broj vrsta, no u Hrvatskoj su native samo tri svojte (*V. myrtillus* L., *V. vitis-idaea* L. i *V. uliginosum* L.), dok je *V. corymbosum* L. ‘pridošlica’ koja svoju nazočnost u flori Hrvatske zahvaljuje uvozu sadnog materijala i početku kultiviranja borovnice. U Hrvatskoj je svakako najraširenija vrsta *V. myrtillus* (borovnica) od koje se sakupljaju bobice koje se kao sezonsko šumsko voće još uvijek može naći na našim tržnicama (Dujmović Purgar i sur., 2007.).

Podatci o vrstama mogu se pronaći u okviru popisa flore ili opažanja istraživača sa terena. Svi ti podatci o *Vaccinium* rodu dosta su oskudni i ne daju dovoljno informacija o



rasprostranjenosti i zastupljenosti u našim krajevima, no taj nedostatak podataka treba shvatiti kao priliku za dodatnim, sustavnim istraživanjima.

Još 60-ih godina prošlog stoljeća je potvrđeno kako je borovnica dobar izvor vlakana, kalcija, željeza i vitamina C, no tek 90-ih se spominju ostali zdravstveni benefiti borovnice. Do tih saznanja je došlo nakon razvoja novih tehnologija tj. u ovom slučaju analitičkih metoda. Prema analitičkoj metodi ORAC (oxygen radical absorbance capacity) koja služi određivanju antioksidativnog učinka, borovnica pokazuje zavidan učinak u odnosu na neko druge voćne vrste (Slika 3.). Učinak je testiran pokusima u kojima su se životinje hranile voćem pa je tako kod štakora zapaženo odgađanje i usporavanje starenja (Maindland i Tucker, 2002.).

Fruits	H-ORAC ( $\mu$ moles TE/100g)	L-ORAC ( $\mu$ moles TE/100g)	Total Phenolics (mg GAE/ 100g)
Apricot	1108	32	79
Black berries	5245	103	660
Blue berries	6520	36	531
Cherries (sweet)	3348	17	339
Chokeberries	15820	242	2010
Cranberries	9382	202	718
Black currants	10060	84	1330
Red currants	3260	127	540
Elderberries	14500	197	1950
Red grapes	1260	-	177
Orange	1785	34	337
Pear	2941	-	168
Plum	6241	17	367
Raspberries	4745	138	502
Strawberries	3541	36	368
Bananas	813	66	230
Mango	988	14	266
Peach	1781	50	148

H-ORAC= Hydrophilic-Oxygen Radical Absorbance Capacity; L-ORAC= Lipophilic- Oxygen Radical Absorbance Capacity; Reference<sup>22</sup>

**Slika 3.** Antioksidativni učinak (ORAC) pojedinih voćnih kultura (Izvor: Dey i sur., 2009.)

Blagodati borovnice ne ogledaju se samo u njezinu dobrom učinku na fizičko zdravlje nego i na mentalno zdravlje. Biokemijski sastav borovnice čine tvari koje nazivamo antioksidansima. Njihova je uloga smanjenje rizika razvoja određenih bolesti te također doprinose jačanju i očuvanju zdravlja našeg tijela. Bioaktivne komponente borovnice nastaju kao rezultat biokemijskih puteva sinteze sekundarnih metabolita. Možemo ih podijeliti na terpene, dušične spojeve i fenole. Fenoli u svojoj strukturi sadrže aromatski prsten na koji je vezana najmanje jedna hidroksilna grupa. Upravo je ona zaslužna za vezanje slobodnih radikala na sebe. Fenoli se dalje dijele na flavonoidne i ne-flavonoidne spojeve, a antocijanini, biljni pigmenti koju daju prepoznatljivu crno-ljubičasto-plavu boju

borovnici ubrajaju se u flavonoide. Sama kvaliteta i količina ovih bioaktivnih komponenti u borovnici ovisit će o sorti, kvaliteti tla tj. supstrata u kojem biljka raste, klimatskim karakteristikama uzgojnog područja, broju sunčanih sati tijekom vegetacije te fazi sazrijevanja u trenutku berbe (Markus Nicoletti i sur., 2015.). Mjerenjem fenola, antocijanina i sekundarnih metabolita borovnice danas se detaljno može za svaku sortu odrediti zdravstvena korist i utjecaj na zdravlje. U bobicama koje sazrijevaju i mijenjaju boju od zelene ka plavoj tj. ljubičastoj dolazi do rasta sadržaja fenola. ORAC analitičke metode pokazuju da se u koži bobica nalazi najveći postotak antioksidanata (Maindland i Tucker, 2002.) dok ostatak bobice sadrži vrlo malo ili niti malo antocijanina. Dakle, borovnica svoja ljekovita svojstva duguje visokom sadržaju antioksidansa u plodu koji služe neutralizaciji štetnog učinka slobodnih radikala.

## **2.2. Proizvodnja borovnice u Hrvatskoj**

Borovnica je najznačajniji predstavnik iz roda *Vaccinium*. Postoje tri vrste borovnice koje se danas najčešće pronalaze na tržištu. To su visokogrmolika borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.), borovnica zečje oko (*Vaccinium ashei* Reade) i niskogrmolika borovnica (*Vaccinium angustifolium* i *Vaccinium myrtilloides*) (Dujmović Purgar i sur., 2007.).

U Republici Hrvatskoj zaostaje proizvodnja borovnice u odnosu na zemlje Europe te ista ne zadovoljava potrebe naših potrošača za borovnicom. Trend potrošnje pak pokazuje porast u potrošnji zbog sve veće informiranosti javnosti o samim zdravstvenim benefitima borovnice i njezinim antioksidativnim svojstvima. Činjenica je da je uzgoj svih vrsta voća u Hrvatskoj u deficitu (osim mandarine) pa tako uz odgovarajuću tehnologiju i primjenu znanja o uzgoju borovnice možemo sa sigurnošću ući u proizvodnju jer završna faza proizvodnje tj. plasman na tržište neće predstavljati problem. Najvažniji čimbenici na koje treba obratiti pažnju ako se odlučimo za proizvodnju borovnice jesu pH vrijednost tla i kvaliteta tla ili supstrata i dakako, zdrav sadni materijal te optimalno izabrana sorta za naše uzgojno područje. Kod nas se najoptimalnijom pokazala sorta Duke (Majhen, 2020.). U Hrvatskoj se borovnica uzgaja uglavnom u supstratima, a to dodatno ulaganje u proizvodnju podiže i samu cijenu proizvoda što je jedan od razloga što borovnica kod nas na tržištu završava prerađena ili smrznuta. Na policama trgovačkih lanaca pronalazimo uglavnom uvoznju borovnicu koja je slabije kvalitete, a cijena joj je oko 70 kuna dok je u direktnoj kupovini koja je puno manje zastupljena cijena između 50 i 60 kuna. Naša zemlja ima geografsku prednost pri uzgoju, a mogućnost dobrog plasiranja povećava i naš tržišni

položaj. Geografska prednost odnosi se na mogućnost da borovnicu kao gotov proizvod, dakle zrele bobice dobivamo u lipnju kada se bilježi nedostatak istih na europskom tržištu.

Majhen (2020.) u svom istraživanju agroekonomskih indikatora proizvodnje prenosi podatke Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i šumarstvu iz 2019. godine koja bilježi uzgoj američke borovnice na 213 ha te sibirske na 71 ha što je ukupno 287 hektara površine pod borovnicom (Tablica 1).

**Tablica 1.** Porast proizvodnje borovnice u RH promatran kroz zasađene hektare (Izvor: Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i šumarstvu; Majhen, 2020.)

<i>Godina</i>	<i>Ukupno zasađenih hektara</i>
2015.	71,41
2016.	116,79
2017.	173,51
2018.	284,32
2019.	287,88



**Slika 4.** Prikaz broja zastupljenosti uzgoja borovnice po županijama Republike Hrvatske izražen u hektarima u 2019. godini (Izvor: Majhen, 2020.)

Slika 4. ilustrira zastupljenost uzgoja borovnice izraženu u hektarima za svaku županiju Republike Hrvatske. Vidljivo je kako je najveća proizvodnja u zapadnoj i sjeverozapadnoj Hrvatskoj. Zagrebačka županija uvjerljivo je prva sa 83,68 zasađenih hektara.

Kod nas tržište sadnog materijala nije dovoljno razvijeno stoga hrvatski proizvođači uvoze sadnice. Najveći proizvođači zdravog sadnog materijala sa odgovarajućom deklaracijom u Europi su Poljska i Nizozemska. Na europskom tržištu postoji puno veća potražnja za borovnicom, no Europa ne uspijeva zadovoljiti potrebe svog stanovništva pa iste nadoknađuje uvozom iz Afrike i Južne Amerike. Prema podacima iz 2017. potrošnja je iznosila 160 000 t, a istovremeno je proizvedeno 105 000 t (Majhen, 2020.). Dakle čak trećinu borovnice Europljani nadoknađuju uvozom sa drugih kontinenata čime se dakako povećava cijena proizvoda zbog potrebe za preoceanskim transportom i pravilnim skladištenjem tijekom transporta radi maksimalnog očuvanja kvalitete do konzumacije.

*US Highbush Blueberry Council* (USHBC) je organizacija koja se bavi istraživanjima vezanim uz proizvodnju borovnice i njezinim utjecajem na zdravlje te služi proizvođačima za edukaciju i uspostavljanje uspješne proizvodnje. Prema podacima USHBC iz 2014. godine svjetska proizvodnja borovnice na 5 kontinenata doseže vrijednost od 1 bilijun funti (Song, 2010.).

Trenutno se najveći dio svjetske proizvodnje borovnice nalazi u Sjevernoj Americi gdje se najviše uzgajaju visokogrmolike sorte (Griffin i Blazich, 2008.). Najveći proizvođači borovnice u svijetu su Sjedinjene Američke Države, Kanada i Čile dok je u Europi to Poljska, Njemačka, Francuska te Nizozemska i Španjolska (Majhen, 2020.).

### **2.3. Razmnožavanje borovnice**

Razlikujemo generativno razmnožavanje tj. spolno razmnožavanje (sjemenkama) i vegetativno ili nespolno razmnožavanje (dijelovima matične biljke). Kada govorimo o generativnom načinu razmnožavanja dolazi do miješanja genetskog materijala dva roditelja, a rezultat je novi genetski materijal. Generativno razmnožavanje je laka metoda, ali često F1 generacija daje 50 % manje ploda. Vegetativno razmnožavanje je često u prirodnim divljim staništima kada se njihovi rizomi otkinu ili bivaju uništeni pod utjecajem nekog od abiotskih čimbenika. Ostale metode vegetativnog razmnožavanja su razmnožavanje putem reznica stabljike ili putem korijenovih reznica. Razmnožavanje

*Vaccinium* vrsta uspješno se provodi bilo zelenim, poluzrelim ili zrelim reznicama čime dobivamo klonove tj. biljke identične matičnoj biljci koja nam je poslužila kao izvor biljnog materijala, a time osiguravamo ujednačenost tj. uniformnost generacije. Najrašireniji način vegetativnog razmnožavanja podrazumijeva razmnožavanje zelenim reznicama. Reznica treba biti duga oko 4 – 6 cm te se takva sadi u odgovarajući supstrat u koji se dodaju hormoni rasta kako bi se uspješno razvio korijenov sustav. Razmnožavanje zrelih reznicama također je dosta raširen način razmnožavanja. Zrele reznice su one čija je stabljika već odrvenjela i kao takve se uzimaju kada je biljka u fazi dormantnosti. Razmnožavanje reznicama kao što je već naznačeno, zahtjeva značajan utrošak vremena od uzimanja reznica, zakorijenjavanja pa do stvaranja odrasle biljke koja će cvjetati i dati plod. Također ograničavajući je čimbenik i činjenica da od jedne matične biljke možemo dobiti samo nekoliko reznica. Mikropropagacija eliminira nedostatke ove tehnike razmnožavanja te pruža mogućnost zadovoljavanja današnjih rastućih potreba tržišta. Uspješnost mikropropagacije kao metode vegetativnog razmnožavanja uvjetuje znanje i informiranost te ispravnu provedbu laboratorijskih metoda i tehnika, a rezultat je očuvanje željenih gena matične biljke i brži način ostvarenja priroda (Debnath i Goyali, 2020.).

### **2.3.1. Mikropropagacija, kultura tkiva in vitro**

Razvojem svijesti o benefitima borovnice za ljudsku prehranu rastu potrebe i zahtjevi na tržištu za bobicama ovog voća. Veliki porast potražnje bilježimo posljednja dva desetljeća koji se posebno vidi na tržištu Kanade, Kine i Turske. Razmnožavanje putem reznica i/ili rizoma je uspješna metoda koja lako daje dobre rezultate, ali oduzima previše vremena i nije primjerena za proizvodnju na veliko. Stoga razmnožavanje putem kulture tkiva postaje sve privlačnije proizvođačima jer omogućava stvaranje velikog fonda biljaka u kratkom vremenu i još k tome na malom prostoru (Debnath i Goyali, 2020.). Cilj mikropropagacije tj. kulture tkiva jest stvaranje fonda biljaka koji će predstavljati uniformnu generaciju jedne matične biljke te biljni materijal koji je slobodan od patogena. Nove tehnologije omogućuju nam visoku stopu razmnožavanja na malom prostoru.

Mikropropagacija se provodi u kontroliranim uvjetima, a sama tehnika omogućuje razmnožavanje putem samo jedne biljne stanice, tkiva ili pak nekog organa biljke (eksplantata). Izdvojeni biljni materijal koji ćemo uvesti u kulturu tkiva naziva se eksplantat. Nakon uvođenja eksplantata u kulturu *in vitro*, općenito možemo razlikovati dva tipa rasta: organizirani i neorganizirani (Jelaska, 1994.). Kada govorimo o

organiziranom rastu razlikujemo sljedeće tipove kultura *in vitro*: kultura čitavih, intaktnih biljaka, kultura embrija, kultura meristema, kultura vegetacijskog vrška izdanka i kultura pojedinačnog nodija. Neorganiziran rast, kao što mu samo ime govori, podrazumijeva tkivo koje ne sadrži prepoznatljive biljne organe nego su to: tkivna kultura ili kalus, kultura stanica u suspenziji (u tekućem mediju), kultura pojedinačnih stanica i kultura protoplasta (Jelaska, 1994.). Eksplantati se uzgajaju na hranjivoj podlozi tj. mediju koji se sastoji od vode, makrohraniva i mikrohraniva, izvora energije tj. nekog ugljikohidrata (uglavnom saharoza), vitamina, regulatora rasta tj. različitih hormona itd. Sve ove komponente medija imaju za cilj opskrbiti biljni eksplantat u optimalnim količinama kako bi se biljka razvijala i rasla. Totipotentnost je koncept na koji se oslanja *in vitro* tehnika. To je sposobnost biljne stanice da se diferencira, proliferira i postupno pretvori u odraslu biljku u određenim uvjetima pod utjecajem određenih hormona. To se uglavnom odnosi na stanice u mladim tkivima i meristemskim tkivima. Izazov je stvoriti cijelu novu biljku iz jedne stanice, no to nije nemoguće. Kada eksplantat dobije pravi stimulans, tj. pravi hormon u pravoj koncentraciji, on se razvija u biljku identičnu matičnoj biljci tj. u klon. *In vitro* tehnologije nude mogućnost produkcije bioaktivnih komponenti tj. sekundarnih metabolita biljaka u većim količinama što ima veliku važnost za farmaceutsku industriju (Jelaska, 1994.).

*In vitro* kulturu borovnica prvi put opisuju Barker i Collins u ranim sedamdesetim. Korišteni su rizomi postavljeni na Whiteov medij bez ikakvih regulatora rasta. Prave zasluge idu Boxusu i Andersonu koji su razvili komercijalnu metodu mikropropagacije bobičastog voća i ta metodologija koristi se i danas. Nickerson i Hall uspijevaju razviti prvu kulturu kalusa niskogrmolike borovnice na Murashige i Skoog mediju koristeći internodije stabljike kao izvor biljnog materijala te dodajući u hranjivu podlogu 2,4 – diklorofenoksiocetenu kiselinu (4,4-D). Danas je najčešća metoda razmnožavanje putem proliferacije bočnih izdanaka i stvaranja adventivnih izdanaka. Najnoviji napredak u tehnologiji vidljiv je u razvoju somatske embriogeneze kod kultivara borovnice i uspostavljanje kultura u bioreaktorima sa tekućim medijem (Debnath i Goyali, 2020.).

Mikrorazmnožavanje je složen proces koji se sastoji od nekoliko koraka i važno je da svaki korak bude pravilno izveden kako bi uspostavili *in vitro* kulturu.

1. Priprema hranjive podloge: dodavanje mineralnih anorganskih soli, ugljikohidrata, vitamina, regulatora rasta, agara itd. u destiliranu vodu
2. Sterilizacija biljnog materijala: razni načini sterilizacije, dodavanje fungicida u hranjivi medij, sterilizacija ionizirajućim zračenjem, ozonom, itd. (Slika 5.)

3. Inokulacija i subkultivacija: procesi u kojima iniciramo sterilizirani biljni materijal na hranjivu podlogu tj. prenosimo ga na svježiju zbog istrošenosti podloge ili potrebe za podlogom drukčijeg sastava
4. Čuvanje u klima komori: prostor za čuvanje *in vitro* kultura u kojem kontroliramo temperaturu (17 – 27 °C) i osvjetljenje, monitoring i praćenje promjena, vođenje bilješki opažanja
5. Aklimatizacija: proces prilagodbe biljke na *ex vitro* uvjete, za ovu fazu je potreban staklenik za daljnji rast biljaka



**Slika 5.** Sterilizacija nodijalnih eksplantata (Izvor: Đorđić, 2020.)

#### **2.4. Željezo u mineralnoj ishrani biljaka**

Željezo je esencijalni element biljne ishrane koji svrstavamo u grupu mikroelemenata. Ima ključnu ulogu u mnogim metaboličkim reakcijama. Koncentracija željeza u zelenim biljnim dijelovima iznosi oko 50 – 100 mg/kg suhe tvari. Oko 80 % ukupnog sadržaja željeza nalazi se u plastidima tj. kloroplastima gdje ima svoju katalitičku ulogu u biosintezi klorofila (Schenkeveld, 2010.). Iz navedenog razloga nedostatak željeza može prouzročiti klorozu i limitirati rast i razvoj biljke. Željezna kloroza se očituje u promjeni boje mladog lišća, najčešće između žila (tzv. međužilna kloroza) u svjetlo zelenu do žutu boju što

dovodi do usporenog rasta i razvoja biljke, smanjenja lisne mase, asimilacijske površine, a samim tim i fotosinteze (Bahat i Stepinac, 2011.).

Osim kloroze na nadzemnim dijelovima biljaka uslijed nedostatka željeza javlja se i inhibicija u izduživanju korijena. Rezultat je kraći, zadebljali korijen koji poprima bradati izgled.

Željezo je slabo topivo u mediju koji ima visoku pH vrijednost (7 – 8,5). Nedostatak željeza kao jednog od vrlo važnih elemenata mineralne ishrane, rezultirat će kako kvantitativnim tako i kvalitativnim gubitcima (ekonomski gubitci). Također, zanimljivo je kako na dostupnost željeza može utjecati i prisutnost drugih elemenata (antagonizam) kao što su bakar ili fosfor koji se natječu sa željezom za stvaranje kelata čime mogu nastati netopivi željezni fosfati.

Najvažnija karakteristika željeza je tendencija u formiranju kelata te sposobnost reverzibilne oksidacijsko – redukcijske reakcije. Biljke najradije usvajaju željezo u obliku  $Fe^{2+}$  iona koji nastaje redukcijom  $Fe^{3+}$  iona uz pomoć kelat reduktaze na membranama prije samog ulaska u citoplazmu (Schenkeveld, 2010.).

Moguće je oplemenjivačkim i genetičkim inženjeringom razviti kultivare koji će s manje poteškoća moći usvajati željezo, no taj je proces dug. Trenutno je najbolje rješenje primjena željeznog kelata i to prvenstveno FeEDDHA koji pokazuje najveću stabilnost (Schenkeveld, 2010.). Tretmani tla sa sintetički proizvedenim željeznim kelatima povećavaju dostupnost željeza i vrlo uspješno rješavaju probleme kloroze uzrokovane nedostatkom istog, no tretman kelatima kao agrotehnička mjera *in situ* (na polju) je vrlo skup zahvat (opravdana primjena samo na visoko dohodovnim kulturama). Nasuprot primjeni *in situ*, kelati pronalaze vrlo široku primjenu u mikropropagaciji biljaka.

#### **2.4.1. FeNaEDTA u kulturi tkiva**

Biljke u *in vitro* kulturi proizvode jako malo ugljikohidrata procesom fotosinteze pa se tijekom aklimatizacije biljka mora navikavati na potpunu fotoautotrofnu ishranu. Stoga veći sadržaj klorofila u lišću povećava šanse za preživljavanje te bolji rast i razvoj tijekom aklimatizacije (Trejgell i sur., 2012.).

Kako bi izbjegli probleme koje donosi kloroza *in vitro* biljkama treba osigurati hraniva u odgovarajućem obliku i koncentraciji. U *in vitro* uvjetima kultivacije željezo predstavlja komponentu složenog hranjivog medija. Tako se primjerice u MS mediju željezo nalazi u



obliku FeNaEDTA kelata u koncentraciji od 36,7 mg/l. Ovaj oblik nije dovoljno stabilan jer se ubrzo stvara željezo fosfat – oblik nedostupan biljci (Trejgell i sur., 2012.). MS i DKW medij mogu sadržavati i željezo u obliku FeNa<sub>2</sub>EDTA kelata. FeEDTA kompleks smatra se slabo stabilnim zbog svoje fotolabilnosti pri čemu se može trajno izgubiti i do 45 % od početne koncentracije željeza u mediju (Padmanabhan i sur., 2017.).

Trejgell i sur. (2012.) u svom istraživanju na *Baptisia australis* iznose kako se u kulturi tijekom prvog tjedna uslijed rasta eksplantata i fotolabilnosti FeEDTA kelata potroši 75 % željeza u mediju. Kod FeNaEDTA kelata uslijed oslobađanja slobodnih željezo iona dolazi do nakupljanja slobodnih kisikovih radikala koji mogu oštetiti mnoge komponente stanice uključujući DNA i proteine. Slobodni ioni željeza mogu se taložiti u obliku željezo fosfata što ih čini nedostupnim biljci, a EDTA može potaknuti proizvodnju formaldehida koji je toksičan za biljke (Zawadzka i Orlikowska, 2009.).

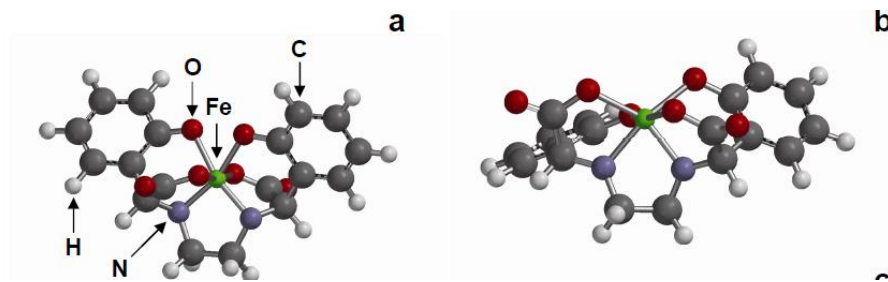
Najčešće korišten izvor željeza u mikropropagaciji lijeske (*C. avellana* L.) je FeEDTA s koncentracijom 6,81 mg/l Fe<sup>2+</sup>. Ova koncentracija u istraživanju Licea-Moreno (2015.) nije rezultirala zadovoljavajuće tj. nije spriječila pojavu kloroze. Isti istraživači povećali su koncentraciju FeEDTA na 10,21 mg/l Fe<sup>2+</sup> ali bez pozitivnog učinka, smanjila se dužina izdanaka i internodija te je inhibiran razvoj korijena. Iz tog razloga FeEDTA zamijenjen je s FeEDDHA kelatom koji se pokazao uspješnijim.

Slabiji rast biljaka na mediju koji sadržava FeEDTA kelat može biti povezan i sa pojačanom produkcijom auksina. Produkcija auksina u vezi je s regulacijskim odgovorima na nedostatak željeza. Nedostatak željeza uzrokuje porast u sadržaju auksina što u konačnici vodi do morfoloških promjena na korijenu - inhibicija elongacije korijena i bubrenje vrhova korijena (Trejgell i sur., 2012.).

#### **2.4.2. FeEDDHA u kulturi tkiva**

Kelatni agens tj. liganid ima sposobnost stvaranja stabilnih, vodotopivih kompleksa s dvovalentnim i trovalentnim kationima čime utječe na njihovu dostupnost, mobilnost i reaktivnost. FeEDDHA je kompleks kelata EDDHA i željeznog kationa Fe<sup>3+</sup>. Fe<sup>3+</sup> vezan je sa dvije karboksilne grupe, 2 fenolne i 2 amino grupe u oktaedarski kompleks visoke stabilnosti koji pri neutralnom pH pokazuje vrlo intenzivno crveno obojenje.

Trenutni put sinteze pri proizvodnji EDDHA na industrijskoj razini polazi od reakcije fenola, etilendiamina i glioksilne kiseline (Schenkeveld, 2010.).



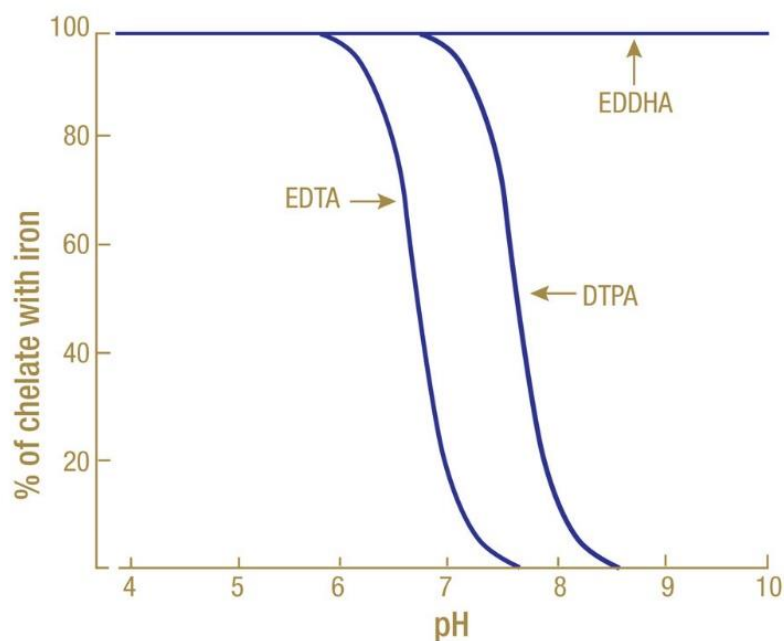
**Slika 6.** Izomeri FeEDDHA: a) racemic o,o-FeEDDHA i b) meso o,o-FeEDDHA (Izvor: Schenkeveld, 2010.)

Sama dekompozicija željeza se veže uz njegov mezo oblik tj. manje stabilni izomer (Jordà i sur., 2014.). Mezo izomer je lako dostupan pri niskim pH vrijednostima i stoga se lako asimilira dok se njegov racemični oblik ponaša kao zaliha željeza. FeEDDHA (kompleks željeza i etilendiamin-di-o-hidroksifeniloctene kiseline) formira dva izomera: Fe(R,R-EDDHA)- + Fe(S,S-EDDHA)- – racemični i Fe(R,S-EDDHA)- - mezo izomer (Slika 6.). Korištenjem 50 % svakog od ovih izomera dobije se kompleks FeNaEDDHA (Jordà i sur., 2014.).

Sastav medija u *in vitro* kulturi također utječe na stabilnost i dekompoziciju FeEDDHA kelata što je usko povezano i s pH vrijednosti. pH medija koji je kisele vrijednosti uzrokuje intenzivnu dekompoziciju. U mediju neutralne pH vrijednosti (i blago kisele) FeEDDHA je vrlo stabilna molekula. Do dekompozicije FeEDDHA kelata dolazi pri pH vrijednosti manjoj od 4, posebno pri pH vrijednosti 1 (Jordà i sur., 2014.).

Kloroza čiji se simptomi povećavaju s trajanjem *in vitro* kulture glavni je pokazatelj nedostatka ili nedostupnosti željeza u hranjivom mediju. Dodatkom kelata FeEDDHA u medij za multiplikaciju eliminirani su simptomi kloroze kod tri kultivara maline te je kod nekih primijećeno povećanje broja adventivnih izdanaka. Najveća stopa regeneracije postignuta je pri koncentraciji 78,8 mg/l FeEDDHA kelata kao jedinog izvora željeza u mediju. Često se kloroza javlja ne zbog istrošenosti medija nego zbog nedostupnosti samog željeza (Zawadzka i Orlikowska, 2006.). Isti autori naglašavaju kako se dodatkom FeEDDHA u medij postiže veći sadržaj klorofila u biljci koja ranije i uspješnije razvija korijenje, također je zabilježeno 30 % povećanje u suhoj tvari. Dobivene su vitalnije i kvalitetnije biljčice nego pri uporabi FeEDTA čime je povećana njihova sposobnost aklimatizacije tj. prelaska na autotrofan način ishrane. U istraživanju Zawadavske i Orlikowske (2009.) uspoređivan je MS medij s i bez dodatka FeEDDHA kod 3 kultivara maline na uspješnost ukorjenjivanja. Tijekom prva dva tjedna razlika između

ukorjenjivanja izdanaka na mediju sa FeNaEDTA i FeEDDHA kelata bila je vrlo uočljiva, te se kasnije izjednačila. Zabilježeno je 100 %-tno ukorjenjivanje eksplantata na mediju sa FeEDDHA, na mediju sa FeCl<sub>3</sub> oko 80 %, 58 % na mediju bez dodatka željeza i 0 % na mediju sa dodatkom FeNaEDTA kelata. Utjecaj željeza na *in vitro* ukorjenjivanje u vezi je s aktivnošću peroksidaze i katalaze od kojih oba sudjeluju u metabolizmu auksina. Stabilniji kelat FeEDDHA se ne suprotstavlja metabolizmu auksina i ne dolazi do nastanka slobodnih kisikovih radikala. Autori zaključuju da dodatkom FeEDDHA u MS medij *in vitro* dolazi do povećanja broja i dužine korijena eksplantata maline. Dobar učinak ukorjenjivanja kelat FeEDDHA pokazuje i na *Prunus* te *Citrus* vrstama. Utjecaj FeEDDHA kelata i njegova uloga u sprječavanju pojave kloroze istraživana je na mnogim vrstama: ruži, papaji, borovnici, japanskoj dinji, banani itd. Dobar učinak ovaj željezni kelat duguje svojoj stabilnosti (Zawadzka i Orlikowska, 2009.). Zbog svog slabog redoks potencijala FeEDDHA pokazuje veću stabilnost u odnosu na FeEDTA pri različitim pH vrijednostima (Slika 7.). Zbog sporog usvajanja željeza preko dodirne površine eksplantata sa hranjivim medijem uporaba stabilnijih oblika kelata produžuje vrijeme dostupnosti željeza biljci. Dodatak FeEDDHA u hranjivi medij rezultirao je smanjenjem hiperhidriranosti (vitifikacije) tkiva te povećanjem sadržaja klorofila što je u konačnici poboljšalo kvalitetu izdanaka. FeEDTA je fotolabilan kelat te već tijekom prvog tjedna u kulturi eksplantati potroše 75 % željeza.

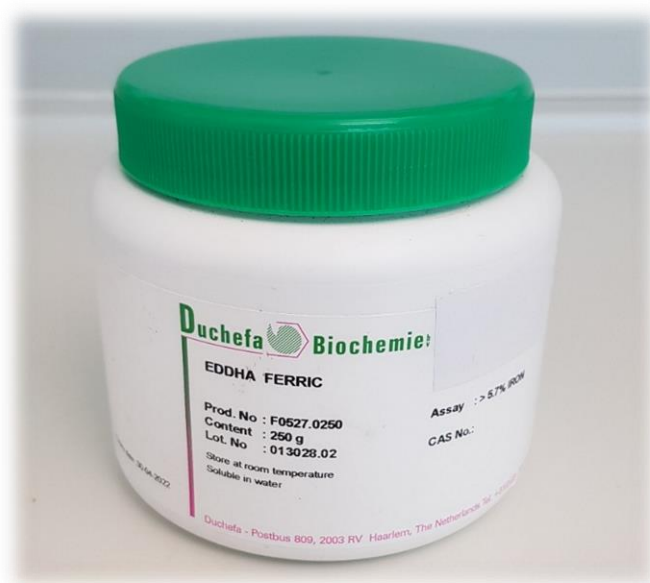


**Slika 7.** Pristupačnost kelatnih oblika željeza pod utjecajem pH vrijednosti

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

Trejjell i sur. (2012.) iznose kako supstitucija FeEDTA sa FeEDDHA kod *Carlina onopordifolie* dovodi do 70 % povećanja sadržaja klorofila u lišću, no FeEDDHA u odnosu na FeEDTA nije pospješio multiplikaciju izdanaka. Kod nekih vrsta zamjena kelata se pokazala efikasnom te je došlo do proliferacije izdanaka i stimulativnog učinka na njihov rast. Kontrastno, zamjena FeEDTA sa FeEDDHA također prati i smanjen porast i dužinu izdanaka kod *Citrullus lanatus* i *Citrus aurantium*. Pozitivan učinak zabilježen je kod sljedećih vrsta: *Rosa hybrida*, *Hibiscus rosasinensis* i *Citrullus lanatus* (Thomas i sur., 2000.).

Rezultati studija na vrsti *Baptisia australis* iz porodice *Fabaceae* ukazuju kako dodatak željeza u obliku FeEDDHA kelata u mediju vodi do poticanja rasta izdanaka. U pokusu su korišteni nodijalni eksplantati inicirani na dva različita medija (MS i DKW medij) s dodatkom FeEDDHA. Stimulacijski učinak FeEDDHA više se isticao u DKW mediju. Glavne razlike između MS i DKW medija čini koncentracija makroelemenata. MS medij sadrži visok sadržaj amonijevih (20,6 mM) i nitratnih iona (39,4 mM). DKW medij sadržava kalcijev nitrat umjesto kalijevog nitrata te ima nešto nižu koncentraciju amonijevih iona (17,7 mM), nisku koncentraciju nikla i visoku koncentracija kloridnih iona te duplo veću koncentraciju cinkovih iona. Mnogi istraživači potvrđuju pozitivan utjecaj dodavanja FeEDDHA kelata (Slika 8.) u medij: papaja, kupina, malina, lijeska, breskva.



**Slika 8.** FeEDDHA – Duchefa Biochemie (Izvor: Đorđić, 2020.)

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Opis laboratorija i cilj istraživanja

Istraživanje je provedeno na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku (FAZOS) u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo (Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo). Laboratorij sadrži svu potrebnu opremu za provođenje tehnike kulture tkiva *in vitro* (Slika 9.). U navedenom laboratoriju vrše se mnoga *in vitro* istraživanja na raznim voćnim vrstama (višnja, borovnica, malina, orah, borovnica, paulovnja, lijeska, vegetativne podloge za trešnju, goji, poncirus, itd.) na polučvrstom i/ili tekućem mediju (TIB sustav). Katedra se bavi znanstveno istraživačkim radom, edukacijom studenata, proizvodnjom sadnog materijala i sekundarnih metabolita.

Cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje utjecaja modifikacije hranjivog medija primjenom kelatizirajućih spojeva željeza na rast i razvoj (morfološke parametre) tri kultivara borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*.



**Slika 9.** Postavljanje pokusa u laminarnoj komori, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

### 3.2. Postavljanje pokusa i tretmani u istraživanju

Pokus je proveden na tri kultivara borovnice: Bluecrop, Duke i Legacy čiji su eksplantati (nodijalni segmenti s aksilarnim pupom) uvedeni u *in vitro* kulturu prijašnjih godina te se na njima obavljaju razna druga istraživanja (Slika 10.).



**Slika 10.** Izvor biljnog materijala – kultivar Legacy (Izvor: Đorđić i Bošnjak, 2020.)

U ovom istraživanju korištena je standardna formulacija WPM hranjivog medija (Lloyd i McCown, 1980.). Detaljan elementarni sastav hranjive podloge primijenjen u svim tretmanima nalazi se u tablici 2.

**Tablica 2.** Sastav WPM medija u istraživanju (Izvor: Lloyd i McCown, 1980.)

Mikro elementi	mg/l	Makro elementi	mg/l	Vitamini i ostali dodatci	mg/l
<i>CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O</i>	0,25	<i>CaCl<sub>2</sub></i>	72,50	<i>Saharoza</i>	30000,00
<i>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></i>	6,20	<i>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O</i>	471,26	<i>Agar</i>	6200,00
<i>MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</i>	22,30	<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	170,00	<i>Glicin</i>	2,00
<i>Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</i>	0,25	<i>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	990,00	<i>Myo-inositol</i>	100,00
<i>ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</i>	8,60	<i>MgSO<sub>4</sub></i>	180,54	<i>Nikotinska kiselina</i>	0,50
		<i>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></i>	400,00	<i>Piridoksin HCl</i>	0,50
				<i>Tiamin HCl</i>	1,00
<b>pH 5,0</b>				<i>Zeatin</i>	2,00

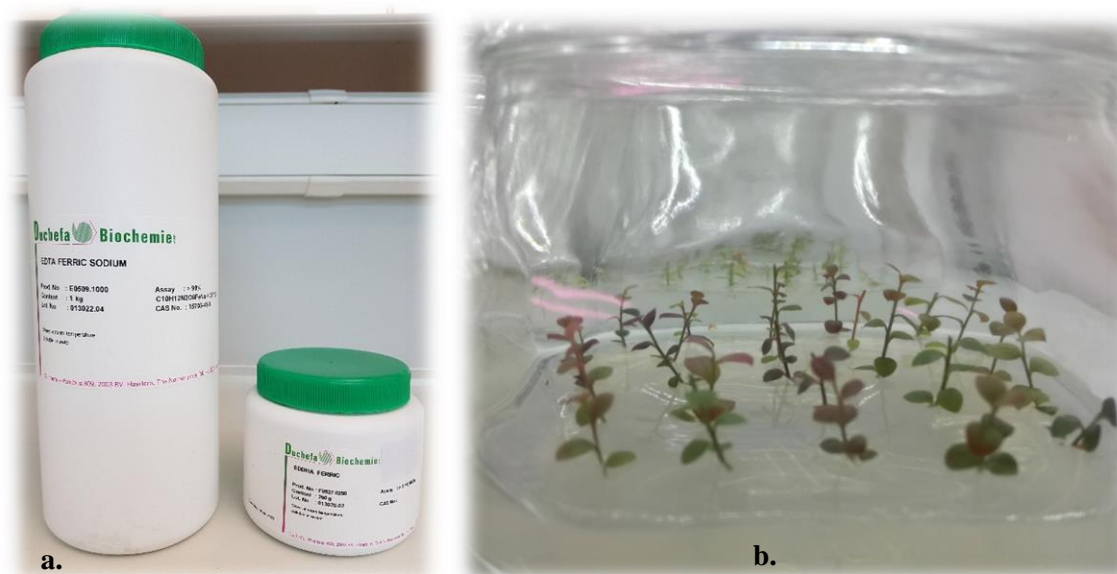


Tretmani (Tablica 3.) su uključivali primjenu dva kelatizirana oblika željeza (Fe). Tretman T1 sadržavao je kelatni oblik željeza FeNaEDTA s koncentracijom od 36,70 mg/l uz sve navedene elemente i dodatke WPM podloge iz prethodne tablice 2. Tretman T2 sadržavao je kelatni oblik željeza FeEDDHA u koncentraciji od 100 mg/l te ostale elemente iz tablice 2. Kelatni oblici željeza naručeni su od nizozemskog proizvođača Duchefa Biochemie (Slika 11a.).

**Tablica 3.** Tretmani u istraživanju

Tretman (kelatni oblik)	Hranjivi medij	Citokinin	Kultivari
<b>FeNaEDTA 36,70 mg/l</b>	WPM	Zeatin 2 mg/l	Bluecrop, Duke, Legacy
<b>FeEDDHA 100 mg/l</b>	WPM	Zeatin 2 mg/l	Bluecrop, Duke, Legacy

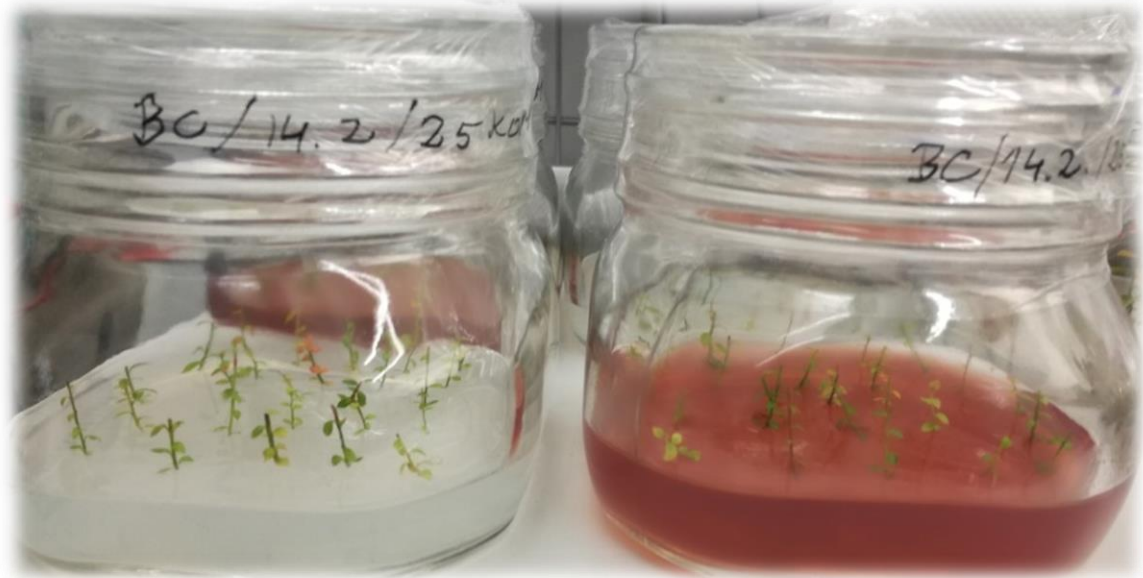
Eksplantati su disecirani na nodijalne segmente veličine oko 2 cm (Slika 11b.) u aseptičnim uvjetima laminarne komore te su inicirani na hranjivi medij. pH vrijednost medija je prije autoklaviranja podešen na 5,0. Sav korišteni laboratorijski pribor i hranjivi medij steriliziran je tijekom 20 minuta u autoklavu pri 121 °C i tlaku od 1,2 bara. Sterilizacija radnog prostora tj. laminarne komore je izvršena 70 % etanolom nakon čega se dodatno koristila i UV lampa u trajanju od 60 minuta.



**Slika 11.** a. korišteni kelatni spojevi željeza u istraživanju i b. nodijalni segmenti borovnice

(Izvor: Đorđić, 2020.)

Svaki tretman sadržavao je po 100 ml medija i 25 eksplantata unutar teglice (Slika 12.) u 2 ponavljanja (2 x 25 = 50 eksplantata po tretmanu x 3 kultivara = 150 eksplantata). Po završetku inicijacije eksplantata na medij teglice su premještene u prostoriju s kontroliranim uvjetima: temperatura 24 °C i fotoperiod 16/8 (16 sati svjetla, 8 sati mrak). Intenzitet svjetlosti iznosio je 3.550 lux-a.



**Slika 12.** Eksplantati kultivara Bluecrop na oba tretmana (Izvor: Đorđić, 2020.)

### 3.3. Mjerenja u istraživanju i obrada podataka

Nakon 30 dana kulture pristupilo se mjerenju morfoloških parametara i evaluaciji pojedinih tretmana u istraživanju (Slika 13. i 14.). Mjereni su sljedeći morfološki parametri:

- Broj izdanaka (prosječni broj novih izdanaka)
- Dužina izdanaka (prosječna dužina/visina novih izdanaka)
- Broj listova (prosječan broj listova na izdancima)
- Multiplikacija (prosječna stopa multiplikacije izdanaka)

Treba napomenuti i da su prilikom mjerenja odbačeni svi zakržljali i nepravilno razvijeni eksplantati odnosno oni koji ne bi mogli poslužiti kao izvor novog biljnog materijala za multiplikaciju.





**Slika 13.** Evaluacija morfoloških pokazatelja (Izvor: Đorđić, 2020)

Prikupljeni podatci analizirani su pomoću Microsoft Office Excel 2013, SAS Software 9.3., programske podrške (2002.-2010., SAS Institute Inc., Cary, USA). Od statističkih metoda korištene su jednofaktorijalna i dvofaktorijalna ANOVA, a razlike između srednjih vrijednosti primijenjenih tretmana ispitane su Fisherovim LSD testom (engl. *Least Significant Difference*) na razini značajnosti od  $p \leq 0,05$ .



**Slika 14.** Mjerenja u istraživanju (Izvor: Đorđić i Bošnjak, 2020.)

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati na razini cijelog pokusa

Na razini cijelog pokusa (Tablica 4.) utvrđene su značajne razlike između kultivara (Bluecrop, Duke i Legacy) u broju izdanaka, broju listova i multiplikaciji. Nema razlike u dužini izdanaka između ispitivanih kultivara. Kultivar Legacy razvio je značajno veći broj izdanaka (6,86) te multiplikaciju (8,30) u odnosu na sve ostale kultivare. Značajno manjim brojem izdanaka (1,62) i multiplikacijom (1,98) rezultirao je kultivar Duke. Također i broj listova je bio značajno manji na kultivaru Duke (8,20) u odnosu na kultivare Bluecrop i Legacy između kojih nije bilo razlike.

Razlika između primijenjenih tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) bila je značajna samo u broju listova (10,93) odnosno značajni veći broj listova producirao je tretman koji je uključivao aplikaciju kelatnog oblika željeza FeNaEDTA. Nije utvrđena značajna razlika između tretmana na broj izdanaka, dužinu izdanaka i multiplikaciju (Tablica 4.).

Interakcija između kultivara i tretmana bila je značajna samo za broj izdanaka ( $p = 0,0349$ ) i multiplikaciju ( $p = 0,0020$ ).

**Tablica 4.** Statističke razlike na razini pokusa između: kultivara (Bluecrop, Duke i Legacy) i tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) te interakcija kultivar x tretman za parametre broj izdanaka, broj listova, dužina izdanaka (cm) i multiplikacija.

Kultivar	Broj izdanaka	Broj listova	Dužina izdanaka	Multiplikacija
Bluecrop	2,26 <sup>B</sup>	10,70 <sup>A</sup>	1,74	2,93 <sup>B</sup>
Duke	1,62 <sup>C</sup>	8,20 <sup>B</sup>	1,80	1,98 <sup>C</sup>
Legacy	6,86 <sup>A</sup>	9,89 <sup>A</sup>	1,88	8,30 <sup>A</sup>
<i>F-test</i>	171,46	14,61	0,85	157,20
<i>p</i>	<,0001	<,0001	0,4316	<,0001
Tretman				
FeNaEDTA	3,69	10,93 <sup>A</sup>	1,80	4,67
FeEDDHA	3,47	8,26 <sup>B</sup>	1,81	4,14
<i>F-test</i>	0,81	48,24	0,02	2,84
<i>p</i>	0,3700	<,0001	0,8834	0,0942
Interakcija kultivar x tretman				
<i>F-test</i>	3,44	2,43	2,23	6,50
<i>p</i>	0,0349	0,0919	0,1110	0,0020

#### 4.2. Razlike između tretmana po kultivarima

Kultivar Bluecrop rezultirao je značajno većim brojem listova (12,16) pri tretmanu s FeNaEDTA. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između primijenjenih tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) za promatrane parametre broj izdanaka i listova te multiplikacija (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) po kultivarima (Bluecrop, Duke i Legacy) za parametre broj izdanaka, broj listova, dužina izdanaka (cm) i multiplikacija.

<i>Bluecrop</i>	Broj izdanaka	Broj listova	Dužina izdanaka	Multiplikacija
<i>FeNaEDTA</i>	2,12	12,16 <sup>A</sup>	1,76	2,72
<i>FeEDDHA</i>	2,40	9,24 <sup>B</sup>	1,71	3,13
<i>F-test</i>	0,86	12,63	0,11	0,73
<i>p</i>	0,3581	0,0009	0,7368	0,3982
<i>Duke</i>	Broj izdanaka	Broj listova	Dužina izdanaka	Multiplikacija
<i>FeNaEDTA</i>	2,20 <sup>A</sup>	9,99 <sup>A</sup>	1,89	3,04 <sup>A</sup>
<i>FeEDDHA</i>	1,04 <sup>B</sup>	6,42 <sup>B</sup>	1,71	0,92 <sup>B</sup>
<i>F-test</i>	73,66	23,41	0,76	35,11
<i>p</i>	<,0001	<,0001	0,3885	<,0001
<i>Legacy</i>	Broj izdanaka	Broj listova	Dužina izdanaka	Multiplikacija
<i>FeNaEDTA</i>	6,76	10,65 <sup>A</sup>	1,74 <sup>B</sup>	8,24
<i>FeEDDHA</i>	6,96	9,12 <sup>B</sup>	2,02 <sup>A</sup>	8,36
<i>F-test</i>	0,09	20,50	18,52	0,03
<i>p</i>	0,7700	<,0001	<,0001	0,8593

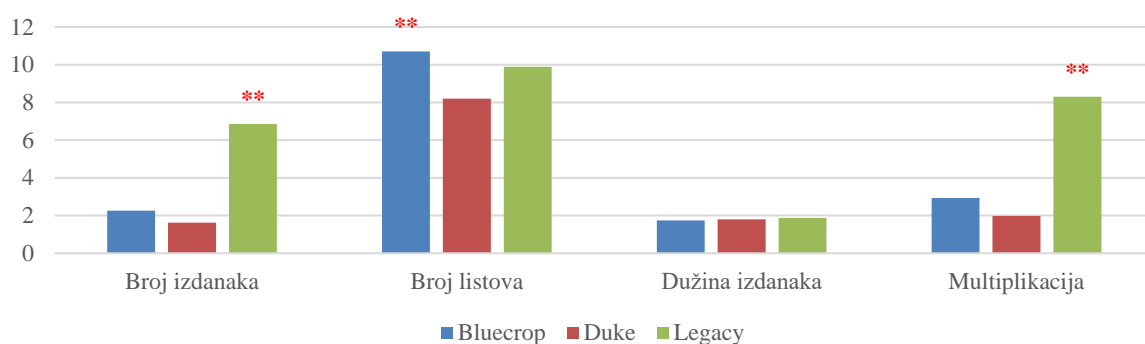
\*Vrijednosti različite slovne oznake statistički su značajne: <sup>AB</sup> razina  $p \leq 0,05$

Kultivar Duke rezultirao je značajno većim brojem izdanaka (2,20), brojem listova (9,99) i multiplikacijom (3,04) na tretmanu s FeNaEDTA. Nije zabilježena značajna razlika između tretmana u dužini izdanaka (Tablica 5.).

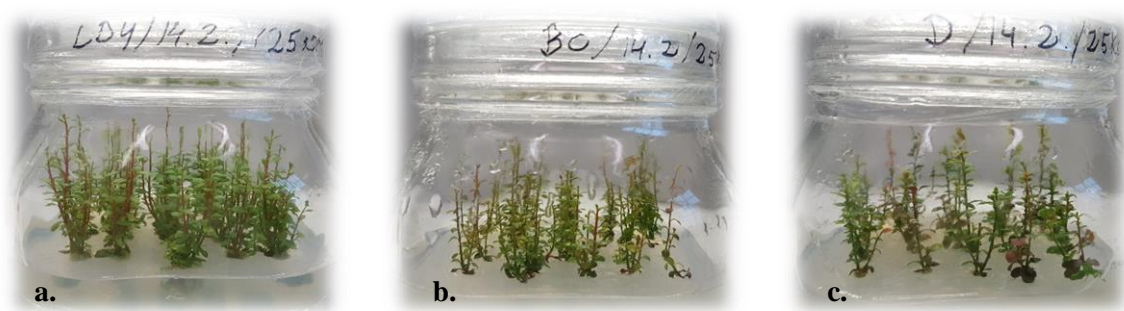
Kultivar Legacy pri tretmanu s FeNaEDTA inicirao je značajno veći broj listova (10,65) dok je dužina izdanaka bila značajno veća pri tretmanu s FeEDDHA (2,02). Nema značajne razlike između tretmana u broju izdanaka i multiplikaciji (Tablica 5.)

## 5. RASPRAVA

Svi tretmani nakon 30 dana kulture razvili su povoljnu biomasu za multiplikaciju (kraj ciklusa) bez znakova kontaminacije. Poznato je da koeficijent multiplikacije biljaka u kulturi *in vitro* ovisi o genotipu (Stoevska i sur., 1995.). Prema tablici 4. i grafikonu 1. vidljiva je morfološka varijabilnost između ispitivanih kultivara po pitanju produkcije broja izdanaka, broja listova i multiplikacije (morfološki pokazatelji). U našem istraživanju kultivar Legacy imao je tendenciju stvaranja značajno većeg broja izdanaka za razliku od ostala dva kultivara, a rezultat tome je i dobivena velika stopa multiplikacije kod ovog kultivara. Najmanji broj izdanaka, listova i multiplikacija dobivena je kod kultivara Duke koji je i poznat po slabijem odgovoru u produkciji biljne mase *in vitro*. Jedino je dužina izdanaka bila podjednaka kod svih kultivara. Sumarno, najbolji promatranih morfološki pokazatelji (broj izdanaka, broj listova i multiplikacija) zabilježeni su na kultivaru Legacy, zatim Bluecrop te najlošiji na kultivaru Duke (Grafikon 1., Slika 15.).



**Grafikon 1.** Razlike između kultivara po promatranim morfološkim parametrima

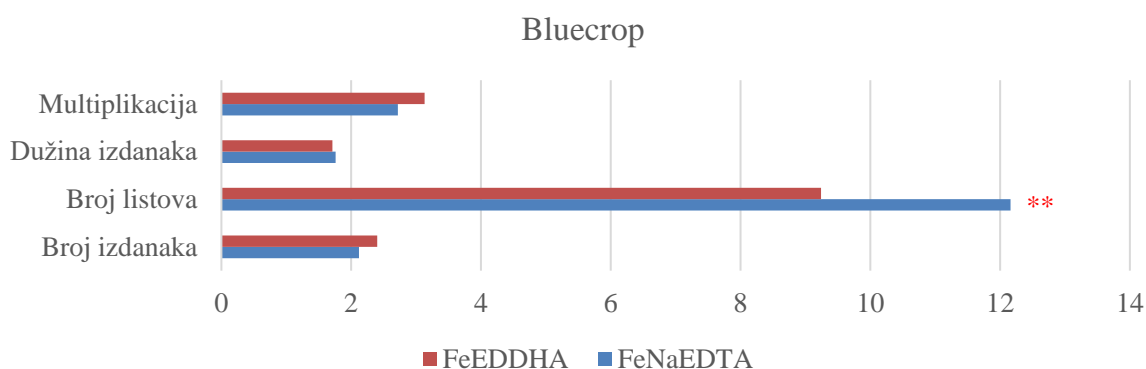


**Slika 15.** Varijabilnost kultivara: a. Legacy, b. Bluecrop, c. Duke (Izvor: Đorđić, 2020.)

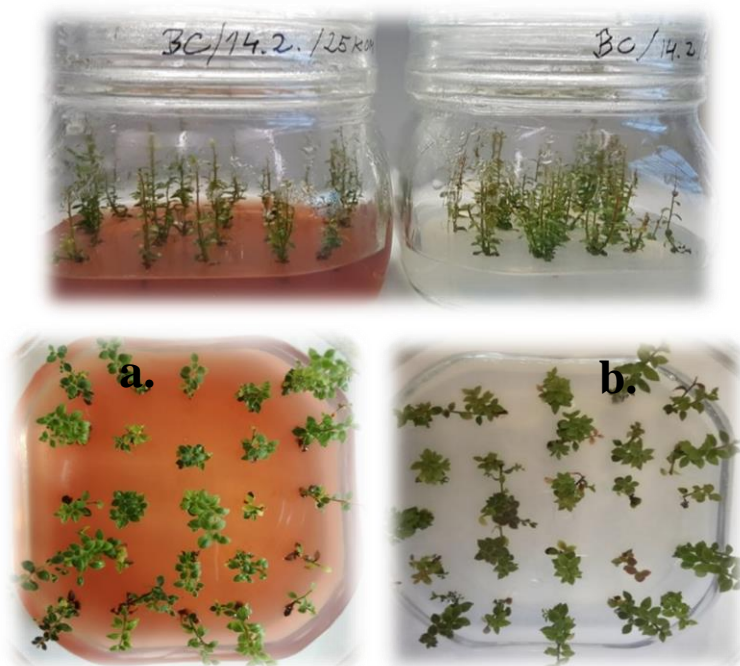
Anorganske mineralne komponente glavni su sastojci medija za kulturu biljnog tkiva te imaju vrlo važnu ulogu u rastu i razvoju *in vitro* biljaka (Murashige i Skoog, 1962.). Jedna od najvažnijih komponenti hranjivog medija je željezo (Fe). Njegova uloga je izuzetno važna u biosintezi klorofila, a nedostatak željeza snažno ograničava rast biljaka i uzrokuje

kloroze (Guerinot, 2001.). Također, željezo mijenja strukturu kloroplasta te utječe na učinkovitost fotosinteze. Mnogi istraživači iznose pozitivne rezultate i metode u supresiji kloroze *in vitro*: dvostruka količina FeEDTA (Sobczykiewicz, 1984.), povećana koncentracija FeEDTA za 50 % te supstitucija FeEDTA s FeEDDHA (Zawadzka i Orlikowska, 2006. i 2009.).

Kultivar Bluecrop (Grafikon 2., Slika 16.) u našem istraživanju nije rezultirao značajnom razlikom između primijenjenih tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) u broj izdanaka, dužina izdanaka i multiplikacija, ali je ipak multiplikacija i broj izdanaka bio nešto veći pri tretmanu s FeEDDHA. Jedino je broj listova na tretmanu s FeNaEDTA bio značajno veći u odnosu na tretman s FeEDDHA što je i logično s obzirom da su izdanci bili malo duži na ovom tretmanu.



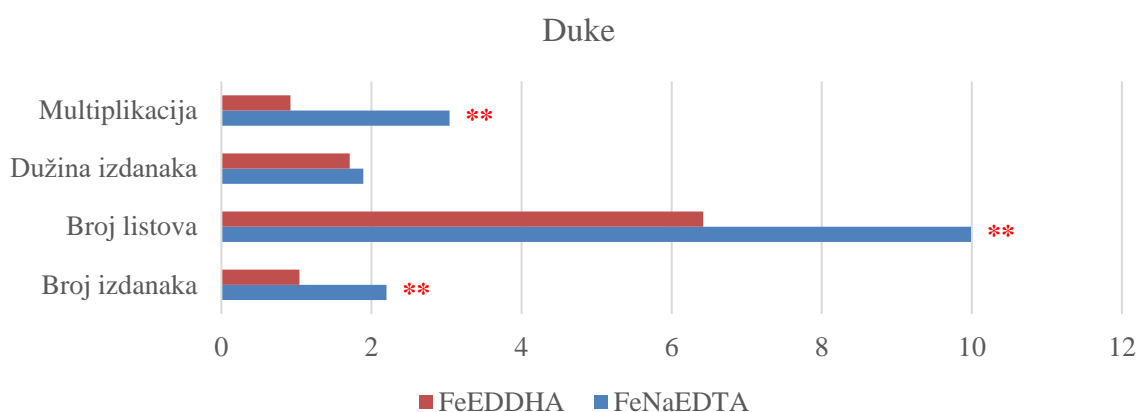
**Grafikon 2.** Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) - kultivar Bluecrop



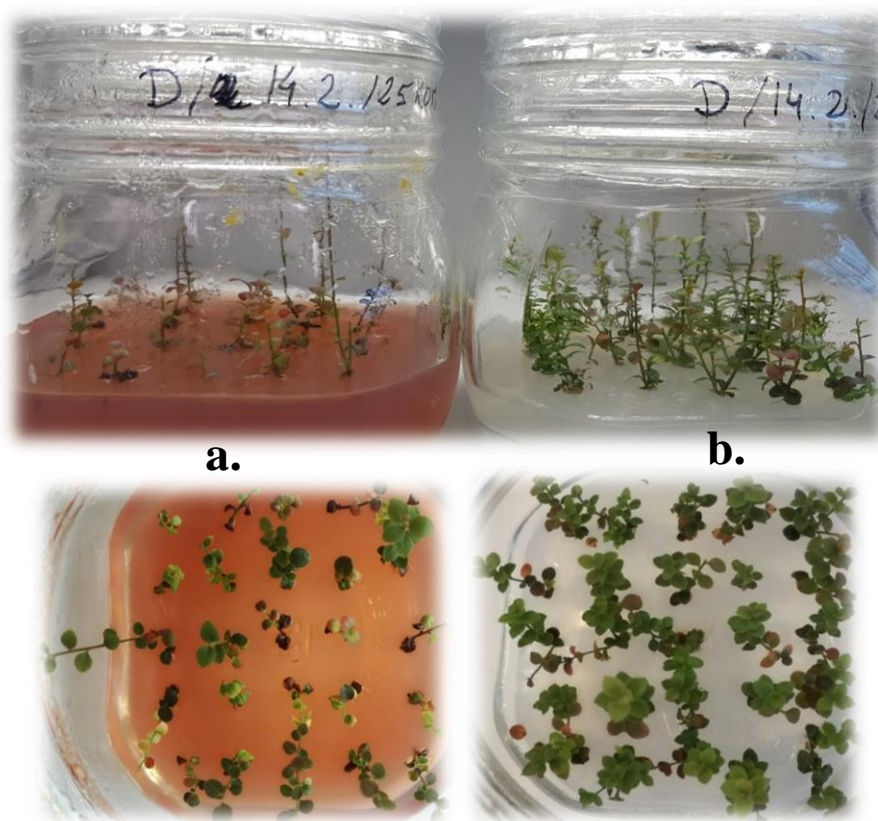
**Slika 16.** Produkcija biomase: a. FeEDDHA i b. FeNaEDTA – kultivar Bluecrop (Izvor: Đorđić i Bošnjak, 2020.)



Kultivar Duke (Grafikon 3., Slika 17.) razvio je značajno veći broj izdanaka, broj listova i multiplikaciju na tretmanu koji je sadržavao željezo u obliku FeNaEDTA, Dužina izdanaka je bila podjednaka na oba tretmana. Dobiveni rezultati ne ukazuju na učinkovitost kelatnog oblika FeEDDHA kod ovog kultivara što nije u suglasnosti s navodima Clapa i sur., 2008. Daljnja istraživanja usmjeriti na određivanje optimalne koncentracije kelatnog oblika željeza FeEDDHA potrebnog za uspješnu mikroporpagaciju ovog kultivara.



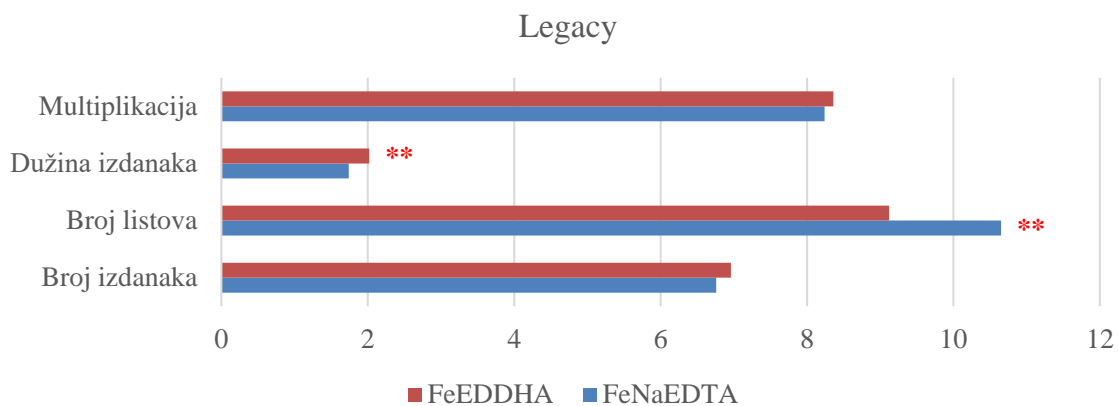
**Grafikon 3.** Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) - kultivar Duke



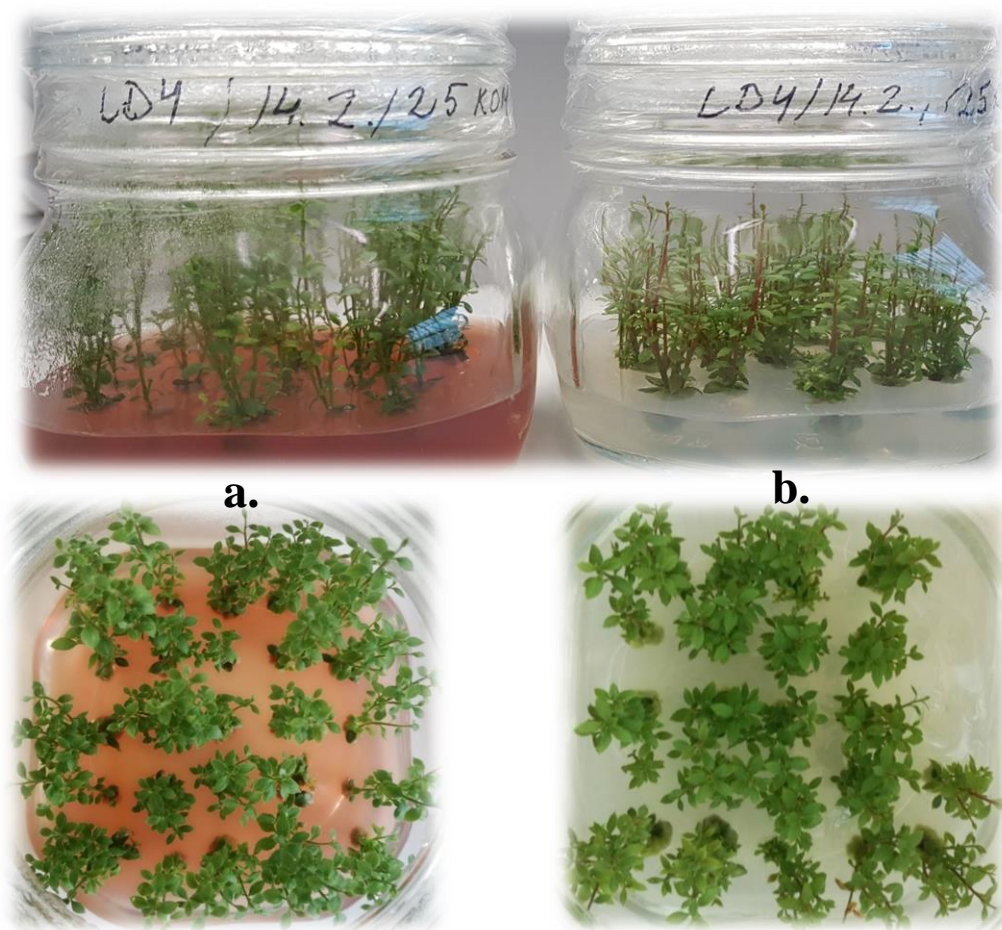
**Slika 17.** Produkcija biomase: a. FeEDDHA i b. FeNaEDTA – kultivar Duke

(Izvor: Đorđić i Bošnjak, 2020.)

Kultivar Legacy (Grafikon 4., Slika 18.) razvio je značajno duže izdanke na tretmanu s FeEDDHA. Također, multiplikacija i broj izdanaka bio je nešto veći u odnosu na tretman s FeNaEDTA. Jedino je broj listova bio značajno veći kod tretmana s FeNaEDTA.



**Grafikon 4.** Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) - kultivar Legacy



**Slika 18.** Produkcija biomase: a. FeEDDHA i b. FeNaEDTA – kultivar Legacy (Izvor: Đorđić i Bošnjak, 2020.)

Prema Shibli i sur., (2002.) visoka stabilnosti FeEDDHA željeznog kelata omogućuje postojanost i održavanje konstantne početne ionske ravnoteže u mediju. Učinkovitost ovog oblika potvrđena je i na drugim kulturama: *Juglans regia* L. (Licea-Moreno i sur., 2015.), *Corylus avellana* L. (Silvestri i sur., 2020.), *Rubus idaeus* L. (Zawadzka i Orlikowska, 2006. i 2009.).

Pretpostavljamo da je u našem istraživanju koncentracija dodanog kelatnog oblika željeza FeEDDHA (100 mg/l) u hranjivi medij bila neoptimalna, odnosno ispod ili iznad idealne koncentracije te je kod kultivara Bluecrop i Legacy došlo do malog (ne značajnog) poboljšanja u multiplikaciji, dužini i broju izdanaka.

Buduća istraživanja potrebno je usmjeriti na određivanje optimalnijih koncentracija kelata željeza FeEDDHA za svaki kultivar.



## 6. ZAKLJUČAK

Razmnožavanje borovnice kulturom tkiva *in vitro* – mikropropagacijom nema alternativu u masovnoj klonskoj reprodukciji biljnog materijala. Jedna od najvažnijih komponenti hranjive podloge je željezo (Fe) koje sudjeluje u mnogim procesima u biljci. Cilj ovog istraživanja (diplomskog rada) usmjeren je na ispitivanje utjecaja modifikacije hranjivog medija primjenom kelatizirajućih spjeva željeza na rast i razvoj (morfološke parametre) borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*.

Na osnovu dobivenih rezultata zaključujemo sljedeće:

- Svi tretmani (eksplantati) uspješno su prošli kroz cijeli proizvodni ciklus (multiplikacija) *in vitro* bez znakova kontaminacije.
- Biljke su dostigle odgovarajuću vegetativnu masu (biomasu) neophodnu za daljnju multiplikaciju nakon 30 dana.
- Utvrđene su značajne razlike između kultivara (Bluecrop, Duke i Legacy) u broju izdanaka, broju listova i multiplikaciji, jedino u dužini izdanaka nije bilo razlike.
- Najbolji morfološki pokazatelji (broj izdanaka, broj listova i multiplikacija) zabilježeni su na kultivaru Legacy, zatim Bluecrop te najlošiji na kultivaru Duke.
- Razlika između primijenjenih tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) bila je značajna samo u broju listova, odnosno značajno veći broj listova zabilježen je na tretmanu koji je uključivao aplikaciju kelatnog oblika željeza FeNaEDTA.
- Nije utvrđena značajna razlika između primijenjenih tretmana na broj izdanaka, dužinu izdanaka i multiplikaciju.
- Pretpostavljamo da je u našem istraživanju koncentracija dodanog kelatnog oblika željeza FeEDDHA (100 mg/l) u hranjivi medij bila neoptimalna, odnosno ispod ili iznad idealne koncentracije te je kod kultivara Bluecrop i Legacy došlo do malog (ne značajnog) poboljšanja u multiplikaciji, dužini i broju izdanaka.
- Buduća istraživanja potrebno je usmjeriti na određivanje optimalnijih koncentracija kelata željeza FeEDDHA za svaki kultivar.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Bahat, Z., Stepinac, D. (2011.): Nedostatak željeza kod biljaka s različitim mehanizmima usvajanja željeza, „case study“: kukuruz i uljana repica. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb
2. Clapa, D., Fira, A., Rusu, T. (2008.): The use of Isubgol and Sequestrene 138 for the in vitro propagation of the highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Journal of food agriculture and environment, 6 (1): 132-134
3. Debnath, S.C., Goyali, J.C. (2020.): In Vitro Propagation and Variation of Antioxidant Properties in Micropropagated Vaccinium Berry Plants-A Review. Molecules. 25 (4): 1-26
4. Dey, G., Negi, B., Gandhi, A. (2009.): Can fruit wines be considered as functional food - An overview, Natural Product Radiance, 8 (4): 314-322
5. Dujmović Purgar, D., Šindrak, Z., Mihelj, D., Voća, S., Duralija, B. (2007.): Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj. Pomologia Croatica, 13 (4): 219-228
6. Gajdošová, A., Hunková, J., Libiaková, G., Fejér, J., Vujović, T. (2018.): Testing of different iron sources and concentrations on shoot multiplication of blackberry (*Rubus fruticosus* L.). Genetika. 50 (1): 351-356
7. Glavan, I. (2019.): Utjecaj sorte specifičnosti i ravnoteže hormona u mediju na učinkovitost mikropropagacije borovnice, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Diplomski rad
8. Griffin, J. J., Blazich, F. A. (2008.): *Ericaceae* – Heath family: *Vaccinium* L. blueberry, cranberry. U: Bonner, F. T., Karrfalt, R. P., (ur.) The woody plant seed manual. U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, Washington, D.C, 1154-1159
9. Guerinot, M. L. (2001.): Improving rice yields – ironing out the details. *Nature biotechnology*, 19 (5): 417-418 DOI: 10.1038/88067
10. Jelaska, S. (1994.): Kultura biljnih stanica i tkiva: Temeljna istraživanja i primjena. VIII. Zagreb: Školska knjiga
11. Lazarević, B., Poljak, M. (2019.): Fiziologija bilja. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
12. Licea-Moreno, R.J., Contreras, A., Morales, A.V., Urban, I., Daquinta, M., Gomez, L., (2015.): Improved walnut mass micropropagation through the combined use of phloroglucinol and FeEDDHA, Plant Cell Tissue and Organ Culture. 123 (1): 143–154 DOI: 10.1007/s11240-015-0822-3

13. Lloyd, G., McGown, B. (1980.): Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot-Tip Culture. Proceedings of the International Plant Propagators' Society, 30: 421-427
14. Majhen, I. (2020.): Agroekonomski indikatori proizvodnje borovnice u Republici Hrvatskoj, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Diplomski rad
15. Maindland, C. M., Tucker, J. W. (2002.): Blueberry Health Information: Some New Mostly Review, *Acta Horticulturae*. 574 (3): 39-43
16. Markus Nicoletti, A., Arocha Gularte, M., Cardoso Elias, M., Santos dos Santos, M., Pio Ávila, B., Monks, J.L.F., Peres, W. (2015.): Blueberry Bioactive Properties and Their Benefits for Health: A Review. *International Journal of New Technology and Research*, 1 (7): 51-57
17. Murashige, T., Skoog, F. (1962.): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3): 473-497
18. Schenkeveld, W. D. C. (2010.): Iron fertilization with FeEDDHA: The fate and effectiveness of FeEDDHA chelates in soil-plant systems, Wageningen University, PhD thesis
19. Trejgell, A., Libront, I., Tretyn, A. (2012.): The effect of Fe-EDDHA on shoot multiplication and in vitro rooting of *Carlina onopordifolia* Besser. *Acta Physiologiae Plantarum*. 34 (5): 2051-2055
20. Padmanabhan, P., Shukla, M.R., Sullivan, J.A., Saxena, P.K. (2017.): Iron supplementation promotes in vitro shoot induction and multiplication of *Baptisia australis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 129 (1): 145–152
21. Sakakibara, H. (2006.): Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *The Annual Review of Plant Biology*. 57: 431–449
22. Shibli, R. A., Mohammad, M. J., & Ajlouni, Z. I. (2002.): Growth and micronutrient acquisition of in vitro grown bitter almond and sour orange in response to iron concentration from different iron chelates. *Journal of Plant nutrition*, 25(7): 1599-1606. DOI: 10.1081/PLN-120005410
23. Silvestri, C., Rugini, E., Cristofori, V. (2020.): The effect of CuSO<sub>4</sub> for establishing in vitro culture, and the role nitrogen and iron sources in in vitro multiplication of *Corylus avellana* L. cv. Tonda Gentile Romana. *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 154 (1): 17-23 DOI: 10.1080/11263504.2018.1549610

24. Sobczykiewicz, D. (1984.): Mass production of raspberry plantlet through micropropagation and rooting them directly in sand-peat mixture. *Fruit Science*. 11 (2): 73-77
25. Song, G.Q. (2020.): *Vaccinium* spp.: Blueberry and Cranberry. U: Litz, R.E., Alfaro, F.P., Hormaza, J.I., (ur.), *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*, 2. izdanje. Wallingford: CABI, 191-205
26. Stoevska, T., Trifonova, A., Karadocheva, D. (1995.): Micropropagation of raspberries (*Rubus idaeus*). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 9 (2-3): 27-30 DOI: 10.1080/13102818.1995.10818837
27. Zawadzka, M., Orlikowska, T. (2006.): Increase in the quality of raspberry cultures under the influence of FeEDDHA. *Acta Horticulturae*. 725 (16): 161-164 DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.725.16
28. Zawadzka, M., Orlikowska, T. (2006.): The influence of FeEDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from leaf explants. *Plant cell, tissue and organ culture*, 85 (2): 145 DOI: 10.1007/s11240-005-9063-1
29. Zawadzka, M., Orlikowska, T. (2009.): Influence of FeEDDHA on in vitro rooting and acclimatisation of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) in peat and vermiculite. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 84 (6): 599-603 DOI: 10.1080/14620316.2009.11512572
30. Jordà, J.D., Bermúdez, M.D., Juárez, M., Cerdán, M., Sánchez-Andréu., J. (2004.): Behaviour of FeEDDHA-Isomers in Nutrient Solutions. *Acta Horticulturae*. 644 (61): 463-468

**Internetski izvori:**

<https://oregonaitc.org>, 24.3.2021.

<https://www.pinterest.se>, 15.1.2021.

<https://www.gcmonline.com>, 1.2.2021.

## 8. SAŽETAK

Razmnožavanje borovnice kulturom tkiva *in vitro* – mikropropagacijom nema alternativu u masovnoj klonskoj reprodukciji biljnog materijala. Jedna od najvažnijih komponenti hranjive podloge je željezo (Fe) koje sudjeluje u mnogim procesima u biljci. Pri Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS, Hrvatska) provedeno je istraživanje s ciljem ispitivanja utjecaja modifikacije hranjivog medija primjenom kelatizirajućih spojeva željeza na rast i razvoj (morfološke parametre) 3 kultivara borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*. Tretmani su uključivali aplikaciju dva kelatna oblika željeza (FeNaEDTA i FeEDDHA). Nakon 30 dana kultivacije izvršena je analiza morfoloških pokazatelja te evaluacija uspješnosti multiplikacije. Utvrđene su značajne razlike između ispitivanih kultivara borovnice u broju izdanaka, broju listova i multiplikaciji. Najbolji rezultati praćeni kroz morfološke pokazatelje (broj izdanaka, broj listova i multiplikacija) zabilježeni su na kultivaru Legacy, zatim Bluecrop te najlošiji na kultivaru Duke. Razlika između primjenjenih tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) bila je značajna samo u broju listova. Nije utvrđena značajna razlika između primjenjenih tretmana na broj izdanaka, dužinu izdanaka i multiplikaciju. Pretpostavljamo da je koncentracija dodanog kelatnog oblika željeza FeEDDHA u hranjivi medij bila neoptimalna odnosno ispod ili iznad idealne koncentracije te je kod ispitivanih kultivara došlo tek do malog (ne značajnog) poboljšanja u multiplikaciji, dužini i broju izdanaka. Buduća istraživanja potrebno je usmjeriti na određivanje optimalnijih koncentracija kelata željeza FeEDDHA za svaki kultivar.

**Ključne riječi:** borovnica, mikropropagacija, FeNaEDTA, FeEDDHA

## 9. SUMMARY

Blueberry propagation by tissue culture *in vitro* (micropropagation) has no alternative in mass clonal reproduction of plant material. One of the most important components of a nutrient medium is iron (Fe) which participates in many processes in the plant. At the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek (FAZOS, Croatia), a study was conducted to examine the effect of nutrient media modification using chelating iron compounds on growth and development (morphological parameters) of tree blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*. Treatments included the application of two chelated forms of iron (FeNaEDTA and FeEDDHA). After 30 days of cultivation, the analysis of morphological parameters and the evaluation of the multiplication rate performed. Significant differences found between the examined blueberry cultivars in the number of shoots, the number of leaves and multiplication. The best results in morphological parameter (number of shoots, leaf number and multiplication rate) was recorded on cultivar Legacy, then Bluecrop and worst on the cultivar Duke. The difference between the applied treatments (FeNaEDTA and FeEDDHA) was significant only in the number of leaves. No significant difference was found between the applied treatments on the number of shoots, length of shoots and multiplication rate. We assume that the concentration of added chelated form of iron FeEDDHA in the nutrient medium was suboptimal, ie below or above the ideal concentration. Consequently, in the examined cultivars there was only a small (not significant) improvement in multiplication, length and number of shoots. Future research should be focused on determining more optimal concentrations of FeEDDHA iron chelates for each cultivar.

**Key words:** Blueberry, Micropropagation, FeNaEDTA, FeEDDHA

## 10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Porast proizvodnje borovnice u RH promatran kroz zasađene hektre.....	7
Tablica 2. Sastav WPM medija u istraživanju.....	18
Tablica 3. Tretmani u istraživanju.....	19
Tablica 4. Statističke razlike na razini pokusa između: kultivara (Bluecrop, Duke i Legacy) i tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) te interakcija kultivar x tretman za promatrane parametre (broj izdanaka, broj listova, dužina izdanaka i multiplikacija).....	22
Tablica 5. Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) po kultivarima (Bluecrop, Duke i Legacy) za promatrane parametre (broj izdanaka, broj listova, dužina izdanaka i multiplikacija).....	23

## 11. POPIS SLIKA

Slika 1. Indijanke u berbi borovnice.....	3
Slika 2. <i>Vaccinium corymbosum</i> L. – morfološke osobine.....	4
Slika 3. Antioksidativni učinak (ORAC) pojedinih voćnih kultura.....	5
Slika 4. Prikaz broja zastupljenosti uzgoja borovnice po županijama Republike Hrvatske izražen u hektarima u 2019.godini.....	7
Slika 5. Sterilizacija nodijalnih eksplantata.....	11
Slika 6. Izomeri FeEDDHA: a) racemic o,o-FeEDDHA i b) meso o,o-FeEDDHA.....	14
Slika 7. Pristupačnost kelatnih oblika željeza pod utjecajem pH vrijednosti.....	15
Slika 8. FeEDDHA – Duchefa Biochemie.....	16
Slika 9. Postavljanje pokusa u laminarnoj komori, FAZOS.....	17
Slika 10. Izvor biljnog materijala – kultivar Legacy.....	18
Slika 11. a. korišteni kelatni spojevi željeza u istraživanju i b. nodijalni segmenti borovnice.....	19
Slika 12. Eksplantati kultivara Bluecrop na oba tretmana.....	20
Slika 13. Evaluacija morfoloških pokazatelja.....	21
Slika 14. Mjerenja u istraživanju.....	21
Slika 15. Varijabilnost kultivara: a. Legacy, b. Bluecrop, c. Duke.....	24
Slika 16. Produkcija biomase: a. FeEDDHA i b. FeNaEDTA – kultivar Bluecrop.....	25
Slika 17. Produkcija biomase: a. FeEDDHA i b. FeNaEDTA – kultivar Duke.....	26
Slika 18. Produkcija biomase: a. FeEDDHA i b. FeNaEDTA – kultivar Legacy.....	27



## 12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Razlike između kultivara po promatranim morfološkim parametrima.....	24
Grafikon 2. Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) - kultivar Bluecrop.....	25
Grafikon 3. Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) - kultivar Duke.....	26
Grafikon 4. Razlike između tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) - kultivar Legacy.....	27

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek  
Sveučilišni diplomski studij povrćarstvo i cvjećarstvo

Diplomski rad

## PRIMJENA KELATIZIRAJUĆIH SPOJEVA SA ŽELJEZOM U MIKROPROPAGACIJI BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.)

Nikolina Đorđić

**Sažetak:** Razmnožavanje borovnice kulturom tkiva in vitro – mikropropagacijom nema alternativu u masovnoj klonskoj reprodukciji biljnog materijala. Jedna od najvažnijih komponenti hranjive podloge je željezo (Fe) koje sudjeluje u mnogim procesima u biljci. Pri Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS, Hrvatska) provedeno je istraživanje s ciljem ispitivanja utjecaja modifikacije hranjivog medija primjenom kelatizirajućih spojeva željeza na rast i razvoj (morfološke parametre) 3 kultivara borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) in vitro. Tretmani su uključivali aplikaciju dva kelatna oblika željeza (FeNaEDTA i FeEDDHA). Nakon 30 dana kultivacije izvršena je analiza morfoloških pokazatelja te evaluacija uspješnosti multiplikacije. Utvrđene su značajne razlike između ispitivanih kultivara borovnice u broju izdanaka, broju listova i multiplikaciji. Najbolji rezultati praćeni kroz morfološke pokazatelje (broj izdanaka, broj listova i multiplikacija) zabilježeni su na kultivaru Legacy, zatim Bluecrop te najlošiji na kultivaru Duke. Razlika između primjenjenih tretmana (FeNaEDTA i FeEDDHA) bila je značajna samo u broju listova. Nije utvrđena značajna razlika između primjenjenih tretmana na broj izdanaka, dužinu izdanaka i multiplikaciju. Pretpostavljamo da je koncentracija dodanog kelatnog oblika željeza FeEDDHA u hranjivi medij bila neoptimalna odnosno ispod ili iznad idealne koncentracije te je kod ispitivanih kultivara došlo tek do malog (ne značajnog) poboljšanja u multiplikaciji, dužini i broju izdanaka. Buduća istraživanja potrebno je usmjeriti na određivanje optimalnijih koncentracija kelata željeza FeEDDHA za svaki kultivar.

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

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

**Broj stranica:** 37

**Broj grafikona i slika:** 22

**Broj tablica:** 5

**Broj literaturnih navoda:** 30

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** borovnica, mikropropagacija, FeNaEDTA, FeEDDHA

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

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

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

# **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek**  
**University graduate study, Vegetable and flowergrowing**

**Graduate work**

## **APPLICATION OF KELATIZING IRON COMPOUNDS IN BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum* L.) MICROPROPAGATION**

Nikolina Đorđić

**Abstract:** Blueberry propagation by tissue culture in vitro (micropropagation) has no alternative in mass clonal reproduction of plant material. One of the most important components of a nutrient medium is iron (Fe) which participates in many processes in the plant. At the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek (FAZOS, Croatia), a study was conducted to examine the effect of nutrient media modification using chelating iron compounds on growth and development (morphological parameters) of tree blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) in vitro. Treatments included the application of two chelated forms of iron (FeNaEDTA and FeEDDHA). After 30 days of cultivation, the analysis of morphological parameters and the evaluation of the multiplication rate performed. Significant differences found between the examined blueberry cultivars in the number of shoots, the number of leaves and multiplication. The best results in morphological parameter (number of shoots, leaf number and multiplication rate) was recorded on cultivar Legacy, then Bluecrop and worst on the cultivar Duke. The difference between the applied treatments (FeNaEDTA and FeEDDHA) was significant only in the number of leaves. No significant difference was found between the applied treatments on the number of shoots, length of shoots and multiplication rate. We assume that the concentration of added chelated form of iron FeEDDHA in the nutrient medium was suboptimal, ie below or above the ideal concentration. Consequently, in the examined cultivars there was only a small (not significant) improvement in multiplication, length and number of shoots. Future research should be focus on determining more optimal concentrations of FeEDDHA iron chelates for each cultivar.

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

**Mentor:** Aleksandar Stanisavljević, Ph.D., full.prof.

**Number of pages:** 37

**Number of figures and pictures:** 22

**Number of tables:** 5

**Number of references:** 30

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** Blueberry, Micropropagation, FeNaEDTA, FeEDDHA

**Reviewers:**

1. Dejan Bošnjak, MSc, president
2. Aleksandar Stanisavljević, Ph.D., full.prof., mentor
3. Monika Tkalec Kojić, Ph.D., member

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