

# Utjecaj nanočestica silicija na anatomske značajke lista borovnice ( *Vaccinium corymbosum* L.) u tekućem imerznom sustavu bioreaktora

---

Bece, Zita

Master's thesis / Diplomski rad

2024

*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:151:997618>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-31**



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

Zita Bece

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

UTJECAJ NANOČESTICA SILICIJA NA ANATOMSKE ZNAČAJKE  
LISTA BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.) U TEKUĆEM  
IMERZNOM SUSTAVU BIOREAKTORA

Diplomski rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Zita Bece

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

UTJECAJ NANOČESTICA SILICIJA NA ANATOMSKE ZNAČAJKE  
LISTA BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.) U TEKUĆEM  
IMERZNOM SUSTAVU BIOREAKTORA

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, predsjednik
2. dr.sc Dejan Bošnjak, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Monika Marković, član

**Osijek, 2024.**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	3
2.1. Borovnica ( <i>Vaccinium ssp.</i> ) .....	3
2.2. Uzgoj borovnice u RH.....	5
2.3. Nutritivna vrijednost i utjecaj na ljudsko zdravlje.....	6
2.4. Mikropropagacija borovnice ( <i>in vitro</i> kultura biljnog tkiva).....	7
2.5. Suvremeni TIB/TIS imerzni sustav bioreaktora.....	9
2.6. Silicij i nano silicij .....	10
2.7. Nanotehnologija .....	12
2.8. Puči.....	13
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	17
3.1. Opis laboratorija .....	17
3.2. Cilj i postavljanje istraživanja.....	18
3.3. Biljni materijal u istraživanju .....	19
3.4. Tretmani u istraživanju.....	20
3.5. Mjerenja u istraživanju.....	21
3.6. Statistička obrada podataka.....	22
<b>4. REZULTATI</b> .....	23
<b>5. RASPRAVA</b> .....	26
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	30
<b>7. LITERATURA</b> .....	32
<b>8. SAŽETAK</b> .....	40
<b>9. SUMMARY</b> .....	41
<b>10. POPIS TABLICA</b> .....	42
<b>11. POPIS SLIKA</b> .....	43

**12. POPIS GRAFIKONA ..... 44**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

## 1. UVOD

Borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) predstavlja voćnu vrstu od iznimnog ekonomskog, nutritivnog i zdravstvenog značaja u Republici Hrvatskoj. Uslijed rastuće potražnje za njenim plodovima, kako na domaćem tako i na međunarodnom tržištu, uzgoj borovnice postaje sve popularniji u našoj zemlji. Ova voćka bogata je vitaminima, mineralima i antioksidansima, što je čini izrazito cijenjenom među potrošačima, a zbog tih kvaliteta često se svrstava u kategorije "supervoća" i "funkcionalne hrane". Borovnica nije samo nutritivno vrijedna, već predstavlja i značajan ekonomski resurs te predmet intenzivnih znanstveno-istraživačkih studija.

U znanstveno istraživačkoj praksi, naglasak se stavlja na razne metode i modele razmnožavanja, tehnologije uzgoja te ispitivanje nutritivne vrijednosti i utjecaja na zdravlje. Jedna od ključnih biotehnoloških metoda u razmnožavanju borovnice je mikropropagacija, koja omogućava brzu i masovnu proizvodnju klonova u kontroliranim i aseptičnim uvjetima. Ova metoda ne samo da zadovoljava tržišne potrebe, već doprinosi očuvanju genetskih resursa i poboljšanju svojstava biljaka. Mikropropagacija borovnice predstavlja jedan od ključnih modela u komercijalnoj proizvodnji ove voćne vrste, odnosno ovom metodom vrlo brzo i masovno proizvodimo visokokvalitetni i fitosanitarno ispravnih sadni materijal.

Uvođenje nanobiotehnologije u kombinaciji s tekućim imerznim (TIB/TIS) sustavom predstavlja suvremeni pristup koji dodatno unapređuje proces mikropropagacije. Tekući imerzni sustavi bioreaktora TIB/TIS sustavi, (TIB – *eng.* Temporary Immersion Bioreactor i TIS – *eng.* Temporary Immersion System) u usporedbi s klasičnim metodama koje koriste polučvrsti medij (agar), omogućuju dinamičnu modifikaciju parametara uzgoja, optimalnu raspodjelu hranjivih tvari i kisika te smanjenje kontaminacije. Ove prednosti doprinose povećanoj stopi multiplikacije, boljoj kontroli uzgojnih uvjeta te smanjenju troškova energije i ljudskog rada.

Nanobiotehnologija, primjenom nanočestica i nanomaterijala, poboljšava biološke procese biljaka. U kontekstu mikropropagacije, nanočestice mogu ubrzati apsorpciju hranjivih tvari, stimulirati rast i razvoj biljaka, te povećati otpornost na bolesti i stresne uvjete. Kombinacijom imerznog sustava s nanobiotehnologijom možemo značajno unaprijediti mikropropagaciju biljnih vrsta. Tekućim imerznim sustavom omogućena je ravnomjerna distribucija nanočestica kroz hranjivu otopinu, što ujedno osigurava veliku dostupnost nanočestica biljkama.

Silicij (Si), drugi najzastupljeniji element na Zemlji, poznat je po pozitivnim učincima na rast biljaka i otpornost na biotičke i abiotičke stresore.

Ovaj diplomski rad usmjeren je na istraživanje utjecaja nanočestica silicijevog dioksida ( $\text{SiO}_2$ ) na anatomske značajke lista borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u tekućem imerznom sustavu bioreaktora SETIS™. Istraživanje je provedeno na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS), Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo. U prvom dijelu diplomskog rada detaljno se opisuje borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.), uključujući porijeklo, biološku klasifikaciju, morfološke karakteristike, ljekovita svojstva te razmnožavanje isključivo tehnikom *in vitro*. Poglavlje „Materijali i metode“ pruža detaljan opis postavljanja istraživanja, korištenih tretmana, promatranih parametara te načina obrade podataka. Na kraju rada, kroz analizu rezultata i raspravu, donosi se zaključak o uspješnosti pokusa, odnosno mogućnosti i utjecaju nanočestica silicijevog dioksida na anatomske značajke lista borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u tekućem imerznom sustavu bioreaktora.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Borovnica (*Vaccinium ssp.*)

Borovnica (*Vaccinium ssp.*) (Slika 1.) pripada obitelji *Ericaceae* koja sadrži oko 450 različitih vrsta (Luby i sur., 1991.). Smatra se da je većina ovih vrsta udomaćena u 20. stoljeću (Lyrene i sur., 2003.). Većina vrsta ovog bobičastog voća nastanjuje područja s kiselim tlama u hladnijim područjima sjeverne hemisfere (Luby i sur., 1991.). Biljke roda *Vaccinium* razlikuju se po habitusu i variraju od epifita, puzavih formi do većih grmova s bobicama. Neke od vrsta mogu formirati krošnju, dok druge mogu proizvoditi nove izdanke direktno iz svojih rizoma (Luby i sur., 1991.).



**Slika 1.** Borovnica – *Vaccinium corymbosum* L. (Izvor: [www.grandflora.stores.jp](http://www.grandflora.stores.jp))

Botanički, taksonomija roda tradicionalno se klasificira u dva podroda, *Oxycoccus* (2 sekcije - brusnice) i *Vaccinium* (21 sekcija - borovnice), iako nova filogenetska analiza sugerira da trenutno priznata taksonomija *Vaccinium* vjerojatno nije monofiletska (Kron i sur., 2002.). Najvažnije kultivirane vrste roda *Vaccinium* nalaze se u sekcijama *Corymbosum*, *Oxycoccus*,



*Vitis-idaea*, *Myrtillus* i *Vaccinium*. Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Republici Hrvatskoj možemo vidjeti u Tablici 1.

**Tablica 1.** Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj (preuzeto iz Dujmović Purgar i sur., 2007.).

Br.	VRSTA	sredozemna Hrvatska	gorska Hrvatska	nizinska Hrvatska	Dinara	Gorski kotar	Ogulin	Plitvice	Velebit	Strabincica	Samboško gorje	Žumberak	Medvednica	Zagreb i Zagrebacka županija	Hrvatsko zagorje	Papuk	Psunj
1	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	+	+	+		+								+			
2	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+	+
3	<i>Vaccinium uliginosum</i> L.		+			+	+										
4	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.		+	+		+			+			+	+				

Komercijalna proizvodnja borovnice većinom uključuje vrste visokog i niskog grma. Kultivari visokogrmolike američke borovnice (*V. corymbosum* L.) ( $2n = 2x = 24$  i  $4x = 48$ ) (Camp, 1945.) najvažniji su u proizvodnji iz roda *Vaccinium*. Prema slici 2., visokogrmolike borovnice uzgajaju se u 37 država SAD-a, u šest kanadskih provincija, te u Australiji, Čileu, Argentini, Novom Zelandu i nekoliko zemalja Azije i Europe (Strik i Yarborough, 2005.).

Borovnica je značajno povećala svoju popularnost tijekom posljednjeg desetljeća. Tijekom 1990. godine ove su se bobice uzgajale u oko 10-ak zemalja širom svijeta (Slika 2.), dok se u 2011. godini uzgoj komercijalno prakticirao u 27 zemalja (Michalska i Łysiak, 2015.).



**Slika 2.** Američka borovnica proizvodnja u svijetu 2020. i 2021. godine (Izvor: [www.gardenerspath.com](http://www.gardenerspath.com) i International Blueberry Organization (IBO))

## 2.2. Uzgoj borovnice u RH

Kao intenzivna kultura borovnica u RH nema veliku tradiciju, a intenziviranje njenog uzgoja započinje tek u zadnjem desetljeću (Bošnjak, 2022.). Rod *Vaccinium* obuhvaća relativno velik broj vrsta, ali u Hrvatskoj su samo tri vrste autohtone: *V. myrtillus* (šumska borovnica), *V. vitis-idaea* (brusnica) i *V. uliginosum* (močvarna borovnica). Četvrta „pridošla“ vrsta je *V. corymbosum* (američka borovnica) (Slika 3.) koja se uvozi i kultivira zbog svojih bobica. Ove vrste rastu na kiselim i tresetnim tlima, preferirajući svijetle šume, rubove šuma, krčevine i čistine (Purgar i sur., 2007.). Borovnica (*V. myrtillus*) je najrasprostranjenija u Hrvatskoj, kao sezonsko šumsko voće. U prirodi, borovnica raste u nizinskim i gorskim krajevima Hrvatske, u crnogoričnim i bjelogoričnim šumama.



**Slika 3.** *V. corymbosum* - Američka visokogrmolika borovnica (Izvor: [www.cabidigitallibrary.org](http://www.cabidigitallibrary.org))

Kultivirana američka visoko grmolika borovnica (*V. corymbosum*) uspješno se uzgaja u našoj zemlji, a najčešći sortiment proizvodnih nasada čine kultivari: Duke, Bluecrop, Chandler, Spartan, Legacy, Darrow, Early blue, Elliot, Patriot i drugi. Sami kultivari američke borovnice mogu se svrstati u više kategorija ovisno o vremenu dozrijevanja, te su tako prisutni kultivari ranog, srednjeg i kasnog dozrijevanja.

Uzgoj borovnice zahtijeva značajna znanja i financijska ulaganja, što čini intenzivni plantažni uzgoj borovnice vrlo izazovnim. Pored prisutnog problema introdukcije ove nove voćne vrste te nepoznavanja tehnologije proizvodnje, ograničavajući faktor njenog širenja u Hrvatskoj predstavlja vrlo mali areal pogodnih lokaliteta s adekvatnim agroekološkim uvjetima (Bošnjak, 2022.). U Hrvatskoj je pod borovnicom oko 213 hektara (Agencija za

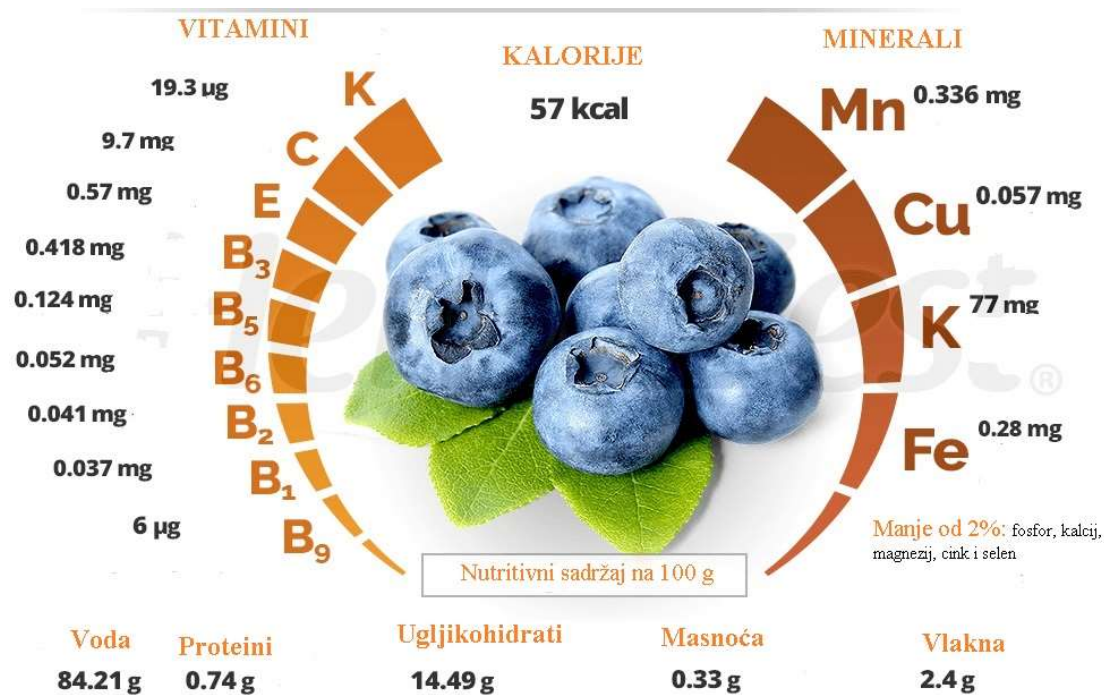
plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju, APPRRR 2019.). Unatoč rastu površina u RH, uzgoj borovnice još nije na razini koja bi zadovoljila potražnju potrošača. Proizvodnja borovnice najzastupljenija je u zapadnoj i sjeverozapadnoj Hrvatskoj, gdje se većina plantaža i nalazi. Trenutna ekspanzija rasta proizvodnih površina uz medijsko eksponiranje podiže svijest potrošača o nutritivnoj vrijednosti borovnice (Bošnjak, 2022.). Danas, borovnica se predstavlja kao funkcionalna hrana, odnosno „supervoće“ s vrlo povoljnim učinkom na ljudsko zdravlje (Bošnjak, 2022.).

### **2.3. Nutritivna vrijednost i utjecaj na ljudsko zdravlje**

Ova ukusna bobica stekla je popularnost diljem svijeta, a ta popularnost raste posljednjih godina, ne samo u vidu svježe konzumacije ploda, nego i u vidu prerade borovnica u druge proizvode koji promiču ljudsko zdravlje. Ove ukusne bobice konzumiraju se kao voće (svježe, sušene, konzervirane ili zamrznute), te kao punjenje za voćne pite i pekarske proizvode diljem svijeta. Prerađeni proizvodi od borovnica, kao što su džemovi, sirupi, voćni sokovi, napitci i koncentрати, također su vrlo popularni. Trenutno postoje brojna nezavisna istraživanja koja ukazuju na pozitivnu korelaciju između konzumacije ovih bobica i prevencije, odnosno odgađanja i početka razvoja kroničnih bolesti poput raka, kardiovaskularnih poremećaja i dijabetesa (Agustinah i sur., 2016; Flores i sur., 2013; Khanal i sur., 2012).

Svježi plodovi (bobice) predstavljaju bogat izvor polifenola, posebice antocijanina poznatog po svom antioksidativnom učinku (Huntley, 2009.; Louis i sur., 2014.). Borovnice su prepoznate kao voće bogato antioksidansima, suzbijaju oksidativni stres, smanjuju upale, reguliraju ekspresiju gena povezanih s procesima različitih bolesti te moduliraju makromolekularne interakcije (Neto, 2007). Plodovi također sadrže i vitamine, minerale u tragovima, mikroelemente, enzime i vlakna, flavonoide i triterpenoide (Slika 4.) (Patel, 2014.; Seeram i sur., 2006.; Neto, 2007.).

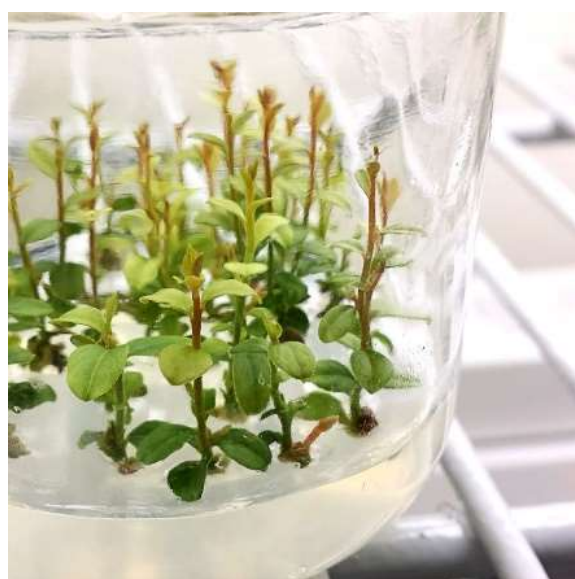
Istraživanja ukazuju na potencijal ovog voća (antioksidacijska aktivnost, antibakterijska, antivirusna i antiangiogena svojstva, detoksikacija, poboljšanje imunološkog sustava i metabolizma hormona, smanjenje hipertenzije, itd) u preventivnom učinku na pojedine bolesti (Freitas i sur., 2008.; Howell, 2008.; McLeay i sur., 2012.; Patel, 2014.).



Slika 4. Nutritivne karakteristike borovnice (Izvor: [www.herbazest.com](http://www.herbazest.com))

#### 2.4. Mikropropagacija borovnice (*in vitro* kultura biljnog tkiva)

Biljna biotehnologija jedna je od najvažnijih znanstveno-tehnoloških dostignuća ovog stoljeća te ima izuzetnu ulogu u razvoju suvremene poljoprivrede i hortikulture (Bošnjak, 2022.). Mikropropagacija biljaka *in vitro* (Slika 5.) predstavlja vrlo važnu granu biljne biotehnologije.



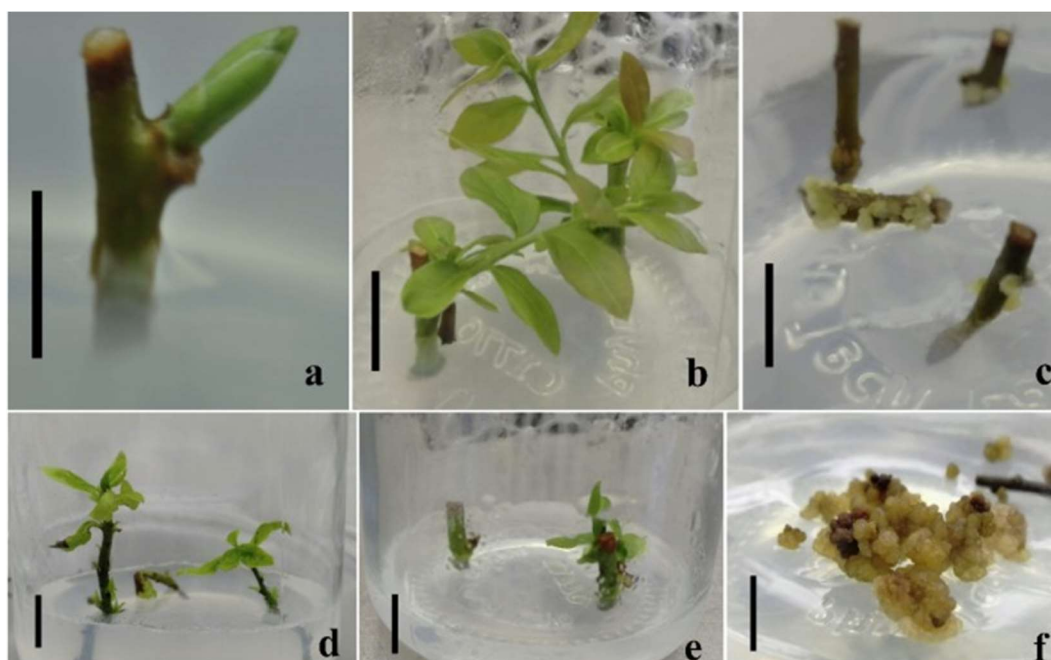
Slika 5. Mikropropagacija - *in vitro* izdanci borovnice, (Izvor: [www.airellesdesfreres.com](http://www.airellesdesfreres.com))



Masovnost proizvodnje fitosanitarno ispravnog te visokokvalitetnog reproduktivnog biljnog materijala u brzom ciklusu, osigurana je upravo upotrebom tehnologije mikropropagacije *in vitro* u aseptičnim uvjetima (Bošnjak, 2022.). U svijetu je još uvijek najzastupljeniji konvencionalni model *in vitro* mikropropagacije biljnog materijala na čvrstom i polučvrstom mediju (Bošnjak, 2022.).

Moderna znanstveno istraživačka praksa razvijenih članica Europske unije oslanja se na upotrebu suvremene biotehnologije (mikropropagacija, kultura tkiva *in vitro*). Reprodukcijski proces biljaka *in vitro* (kultura tkiva, mikropropagacija) predstavlja suvremeni biotehnoški proces masovne proizvodnje genetski identičnih, fiziološki uniformnih i zdravih biljaka (Bošnjak, 2022.).

Kultura tkiva *in vitro* predstavlja aseptičnu kulturu biljnih stanica, tkiva, organa ili cijele biljke (Slika 6.) u kontroliranim uvjetima najčešće za klonsku proizvodnju biljaka (Thorpe T., 2007.). Dobiveni klonirani biljni materijal predstavlja vjerni tip ishodišnog genotipa. Kontrolirani uvjeti uzgoja pružaju kultivaru okruženje pogodno za idealni rast i razvoj. Ti uvjeti uključuju odgovarajuću opskrbu hranjivim tvarima, stabilni pH medija, odgovarajuću temperaturu i ostale okolišne parametre (Hussain A. i sur., 2012.).



**Slika 6.** Prikaz razmnožavanja, razvoja kalusa i uvođenja borovnice u kulturu tkiva; a. i d. – razvoj izdanka, b. i e. – formiranje i rast nodijalnih izdanaka, c. i f. – stvaranje kalusa (preuzeto iz Qiansheng i sur., 2021.)

Tehnologija mikropropagacije ima velik potencijal u proizvodnji visoko kvalitetnog biljnog materijala, izolaciji korisnih genotipovima s boljom otpornošću na bolesti i tolerantnosti na stresne uvjete (Brown i Thorpe, 1995.).

U klonskoj reprodukciji vrsta iz roda *Vaccinium*, mikropropagacija predstavlja moćan alat za brzo umnažanje novonastalih kultivara, te za uspostavljanje *in vitro* banke gena *Vaccinium* spp. *In vitro* tehnika kod ove voćne vrste u početku se koristila za brzo umnažanje novih kultivara uslijed njenog sporog umnožavanja tradicionalnim konvencionalnim tehnikama - reznice (Lyrene, 1978., 1980.; Reed i AbdelnourEsquivel, 1991.; Wolfe i sur., 1993.).

U recentnim istraživanjima na mikropropagaciji borovnice najčešće se koriste WPM (Woody Plant Medium, Lloyd i McCown, 1980.) i MS (Murashige i Skoog, 1962.) hranjivi mediji te njihove razne modifikacije i kombinacije koncentracija i/ili pojedinih elemenata medija (Song i Sink, 2004.; Tetsumura i sur., 2008.; Debnath, 2009.; Liu i sur., 2010.; Ruzic i sur., 2011.; Lyrene, 1978., 1980.; Reed i Abdelnour Esquivel, 1991.; Wolfe i sur., 1993.; Tetsumura i sur., 2008.).

## **2.5. Suvremeni TIB/TIS imerzni sustav bioreaktora**

Potreba korporativnog rasta, povećanja učinkovitosti i automatizacije, odnosno globalne masovnosti proizvodnje i opskrbe nameće uporabu imerznih TIB/TIS sustav bioreaktora nove generacije (TIB, eng. *Temporary Immersion Bioreactor*; TIS, eng. *Temporary Immersion System*) kao neophodno tehnološko rješenje u suvremenoj biotehnologiji (Bošnjak, 2022.).

Bošnjak, (2022.) navodi prednosti ovog sustava koje se očituju kroz smanjenje potreba za manipulativnim prostorom, kratkim vremenskim intervalom proizvodnje, manjom količinom inicijalnog baznog početnog biljnog materijala, dugog čuvanja klonskog biljnog materijala, prenošenja, itd. Konvencionalni model mikropropagacije biljnog materijala *in vitro* ograničen je uporabom agara (zgušnjivač za čvrsti ili polučvrsti hranjivi medij = gel) koji ujedno i poskupljuje samu proizvodnju za razliku od suvremenog imerznog sustava bioreaktora (TIB/TIS), (Bošnjak, 2022.).

Sustav se sastoji od fizički odvojenih posuda s biljkama (Slika 7.) te posuda s hranjivim medijem. Hranjivi medij pomoću pneumatike i kontrolne jedinice (CPU i software) u zadanom ciklusu povremeno potapa biljni materijal s ciljem podmirenja svih životnih

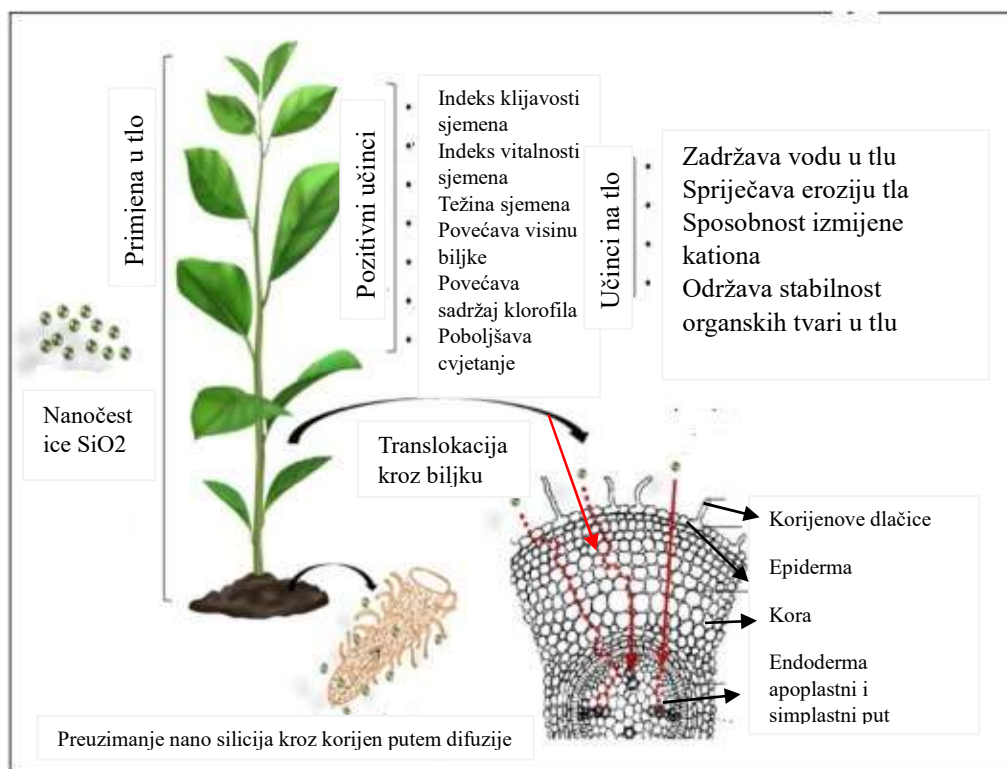
potreba. Jedna od važnih komponenti TIB/TIS sustava je računalna kontrolna upravljačka jedinica – CPU te pneumatska jedinica (kompresor). Pneumatska jedinica mora stvarati vrlo čisti i ne kontaminirani (sterilni) suhi zrak. Veza između pneumatskih elemenata i upravljačke jedinice mora biti savršena kako bi rad bioreaktora bio vrlo precizan i kontroliran.



**Slika 7.** Mikropropagacija borovnice u SETIS™ bioreaktoru (preuzeto iz Clapa i sur., 2019.)

## 2.6. Silicij i nano silicij

Silicij (Si) je najzastupljeniji element za zemlji nakon kisika. Ipak, uloga silicija u biologiji nije dovoljno shvaćena jer se Si ne smatra esencijalnim elementom. Sadržaj Si u biljci može doseći razine makroelemenata (Epstein, 1994.; 1999.). Neke biljne vrste akumuliraju Si od 0,1 do 10 % stvarne koncentracije (Cherif i Belanger, 1992.). Nano strukturni silicijev dioksid ( $\text{SiO}_2$ ) nakon apsorpcije (Slika 8.) može stvoriti film na stjenkama stanica te na taj način može smanjiti transpiraciju, povećati otpornost na bolesti i poboljšati rast biljaka u stresnim uvjetima visoke temperatura i zaslanjenosti tla (Gillman i sur., 2003.; Lim i sur., 2012.; Locarno i sur., 2011.; Shetty i sur., 2012.; Stamatakis i sur., 2003.). Također, nano struktura silicijevog dioksida može povećati tvrdoću stanične stjenke (Lin Bao i sur., 2004.).



**Slika 8.** Pozitivan utjecaj nano čestica silicija na biljku i tlo  
(preuzeto i prilagođeno iz Jyoti Mathur i sur., 2022.)

Iako je Si kvantitativno glavni anorganski sastojak viših biljaka, element se ne smatra hranjivom za biljke i nije uključen u formulacije kulturnih otopina koje se koriste u istraživanjima na biljkama. Biljke siromašne silicijem često su strukturno slabe, imaju abnormalan rast i razvoj, te su osjetljivije na abiotičke i biotičke stresove (Rafi i sur., 1997.).

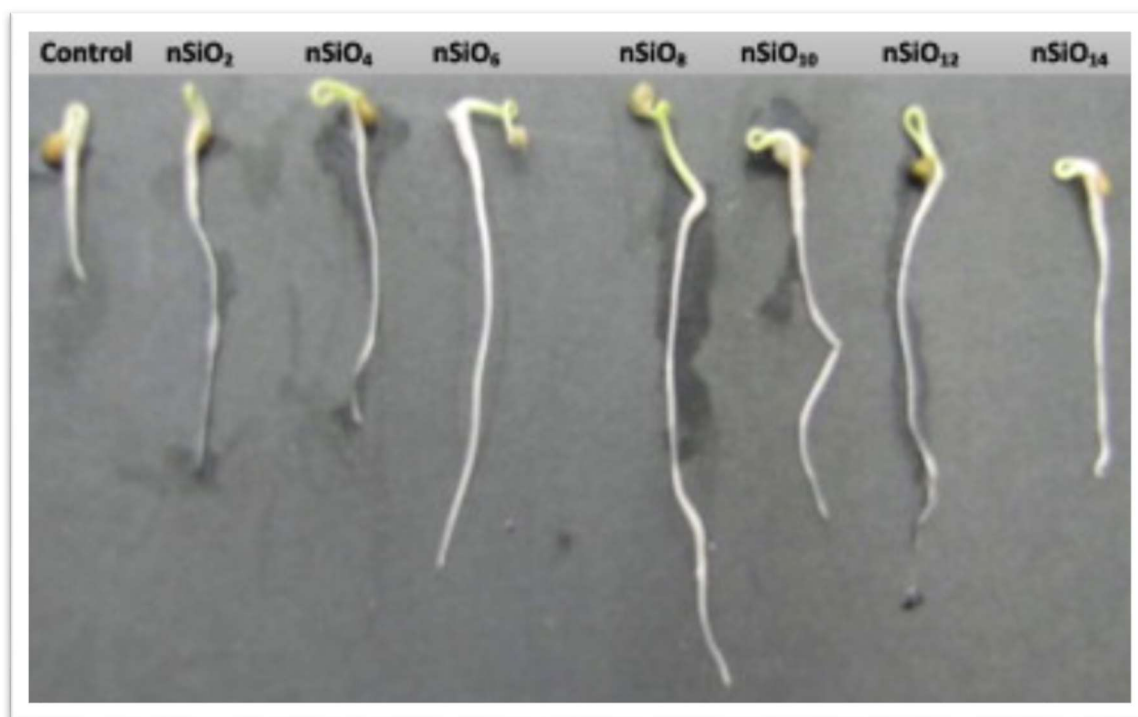
Dodavanjem Si u medij za kulturu tkiva povećava se stabilnost stanica, tkiva i organa biljaka (Sivanesan i Park, 2014.). Rast biljaka *in vitro*, biomasa i anatomija biljaka poboljšana je dodavanjem Si u oblicima kao što su: natrijev silikat ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  - 1 ppm) kod jagode (*Fragaria x ananassa* Duch.), (Braga i sur., 2009.), kalcijev silikat ( $\text{CaSiO}_3$  - 1000 ppm) kod banane (*Musa sp.* Mačã (Silk) banana), (Asmar i sur., 2013.) i kalijevog silikata ( $\text{K}_2\text{SiO}_3$  - 200 ppm) kod begonije i maćuhice (*Begonia semperflorens* Link et Otto i *Viola x wittrockiana* Hort.), (Lim i sur., 2012.). Regulacija rada puči ili poboljšanje transpiracije kroz puči ukazuje da Si snažno utječe na vodni režim biljke (Ming i sur., 2012.). Polimerizacija Si u stanicama epiderme utječe na integritet stanične stijenke (Dakora i Nelwamondo, 2003.) i njihovu strukturnu stabilnost tijekom stresnih uvjeta (Tripathi i sur., 2016.).



## 2.7. Nanotehnologija

Biotehnologija ima ključnu ulogu u masovnoj proizvodnji poboljšanih biljnih genotipova (*in vitro* kultura tkiva, klonsko razmnožavanje). Ona može pomoći i u razmnožavanju biljnih vrsta koji sadrže korisne biološke aktivne tvari (aditive za hranu, pigmente, farmaceutske proizvode, biopesticide, itd.).

Nanotehnologija, predstavlja važno područje u istraživanju temeljeno na modernim materijalima – nanočesticama (NP). Ovi materijali specifični su po svojim: veličinama, oblicima i distribuciji. Primjene korištenja nanomaterijala i NP se vrlo brzo razvija (Jain i sur., 2009). Nanočestice su pokazale svoju važnost u različitim granama biljne biotehnologije. Dokazana je njihova učinkovitost u mnogim istraživanjima, od pojedinih faza kulture tkiva (dezinfekcija, diferencijacija kalusa), stvaranja somaklonalnih varijacija, dobivanja genetski modificiranih organizama do ostalih oblika primjene kao što je produkcija sekundarnih metabolita (Kim i sur., 2017.). U kulturi biljnog tkiva, postoji nekoliko istraživanja temeljenih na nanotehnologiji, a posebice upotrebi NP u klijanju sjemena (Slika 9.), poboljšanju rasta biljaka, genetičkim modifikacijama biljaka, zaštiti bilja, itd. (Siddiqui i Al-Whaibi, 2013; Wang i sur., 2016; Ruttkay-Nedecky i sur., 2017).



**Slika 9.** Aplikacija nano-silicija i utjecaj na klijavost sjemena rajčice (preuzeto iz Siddiqui i Al-Whaibi, 2013.)

## 2.8. Puči

Biljke za svoj rast i transpiraciju (disanje) koriste ali i gube puno vode. Kada je dostupnost vode ograničena, jedan od brzih odgovora biljaka je u vidu zatvaranja puči, mikroskopskih pora koje se obično nalaze u epidermi lista i zeljastih izdanaka (He J., Liang Y., 2018.).

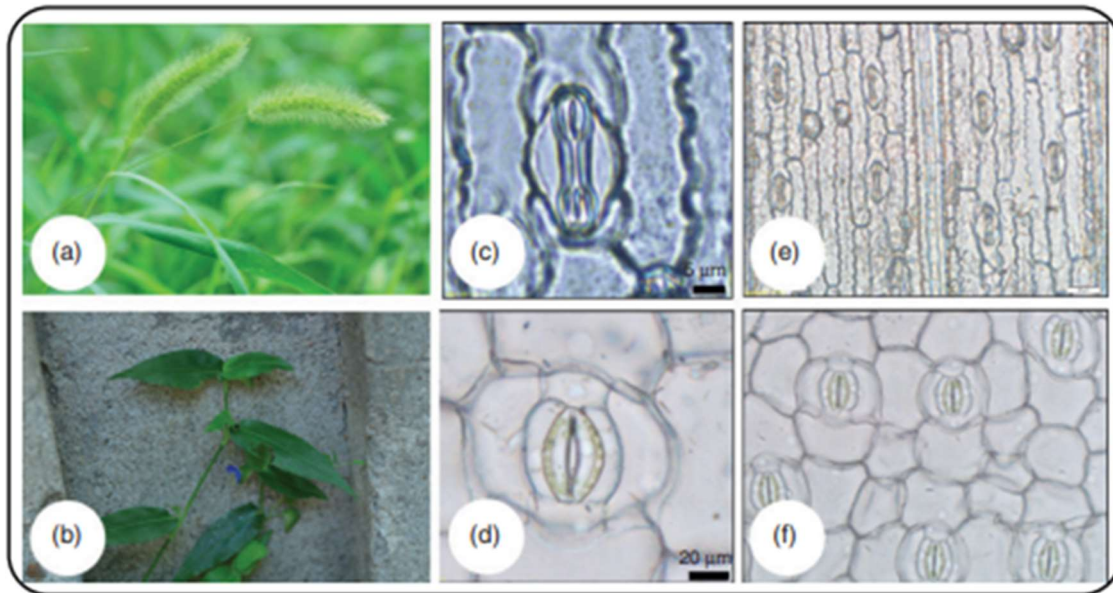
Puči su evolucijski vrlo stare, a pronađene su na fosilima starim više od 400 milijuna godina. Iako su se veličina, broj i raspored puči te njihove okolne stanice diversificirale, morfologija pojedinačnog kompleksa puči ostala je uglavnom nepromijenjena. Središnja pora omeđena je parom stanica zapornica koje potječu iz iste matične stanice, a ispod njih se nalazi substomatalna šupljina smještena na mezofilnim stanicama (He J., Liang Y., 2018.).

Puči (jednina, puč), ponekad je anglizirana kao "stoma", što na grčkom znači 'usta', jer nalikuje sićušnim ustima okruženu natečenim usnama. Puči su zapravo par zaštitnih stanica, koje mogu nabubriti da se otvore ili smanjiti oticanje kako bi zatvorili središnju poru kroz koju voda kao para prolazi u atmosferu. Biljke koriste puči za simultanu regulaciju unosa CO<sub>2</sub> i gubitka vode, te izravno utječu na stopu asimilacije CO<sub>2</sub> i transpiracije (Raven, 2002.; Ruzsala i sur., 2011.).

Najvažnija karakteristika puči je da se mogu otvarati i zatvarati, a promjena veličine otvora regulira izmjenu plinova (Jones i sur., 2003.; Doblin i sur., 2010.; Amsbury i sur., 2016.). Otvaranje puči, proces koji je ovisan o energiji i citoplazmi, također proizlazi iz transporta, nakupljanja i otpuštanja osmotski aktivnih otopljenih tvari (Santelia i Lawson, 2016.).

Biljke bez korijena često se uzgajaju *in vitro* gdje je atmosfera vrlo vlažna, a protok vođen razlikom u potencijalu vode posljedično je smanjen. Unatoč tome, čini se da u kulturi tkiva još uvijek postoji dovoljan protok vode (Beruto i sur., 1999.) koji može utjecati na puči koje budu konstantno otvorene (De Klerk i Wijnhoven, 2005.). Međutim, treba napomenuti da su u kulturi tkiva puči uvijek otvorene na dijelu eksplantata koji je izložen plinovitoj fazi (De Klerk i Wijnhoven, 2005.), a isto se može odnositi i na tkiva koja su izložena polukrutom ili tekućem mediju.

Što je više puči po jedinici površine (gustoća puči), to se više viška vode oslobodi, a CO<sub>2</sub> primi. Ravnoteža između ova dva procesa ovisi o odgovoru puči na unutarnje i vanjske podražaje te zahtjevu mezofila prema CO<sub>2</sub> (Lawson i Blatt, 2014.).



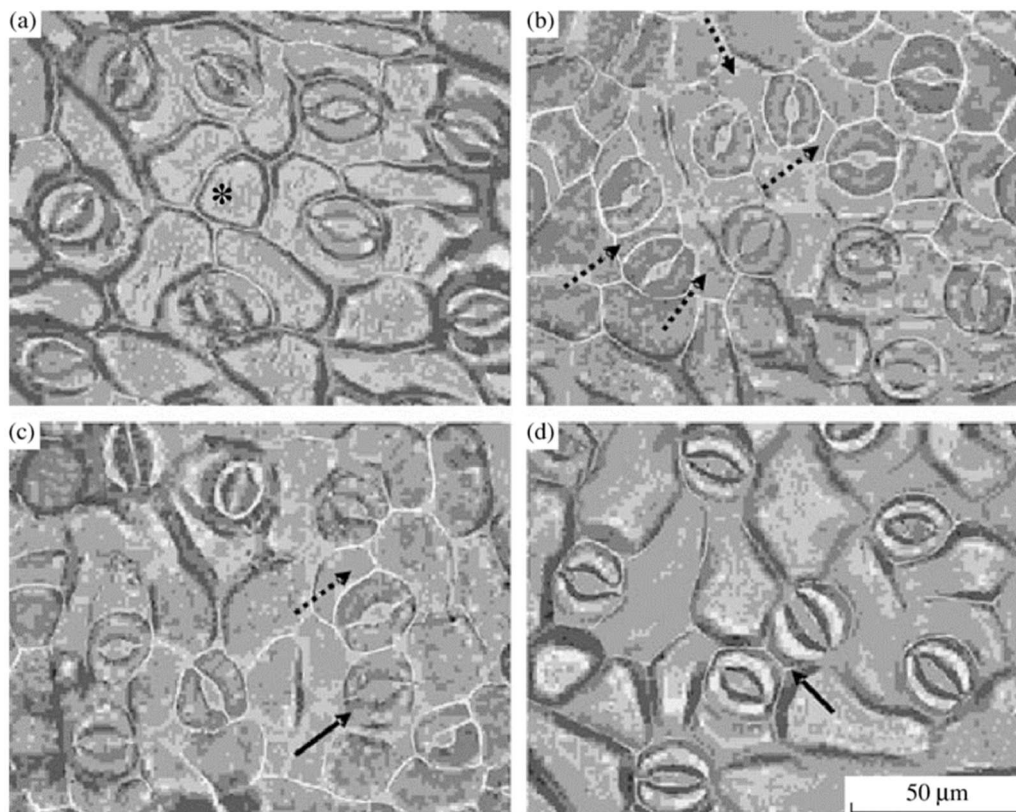
**Slika 10.** Fenotipovi i raspodjela puči: a, c (puči u obliku bućice kod biljke *Setaria viridis*, tipične za trave), b, d (puči u obliku bubrega, tipične za biljke poput *Commelina communis*), e (puči kod trave su strogo raspoređene u nizovima stanica s identičnom orijentacijom), f (puči kod *C. communis* su raspoređene raštrkano i anizotropno), (preuzeto iz He J., 2018.).

Postoje dvije različite vrste stanica zapornica, u obliku bućice i u obliku bubrega, predstavljene biljkama *Setaria viridis* (Slika 10. a, c i e) i *Commelina communis* (Slika 10. b, d i f). Trenutni dokazi podržavaju tezu da su puči sa stanicama zapornicama u obliku bućice evolucijski naprednije i fiziološki učinkovitije, jer njihove stanice zapornice zahtijevaju manje otopljenih tvari i manje vode za postizanje određenog povećanja otvora (Raschke, 1975; Hetherington i Woodward, 2003).

Pore puči također se mogu aktivno zatvoriti kako bi se spriječio ulazak mikroba te na taj način zaštititi biljku od infekcija patogenima (Melotto i sur., 2006.). Puči mogu imati veliki utjecaj na globalne cikluse ugljika i vode, kao i na konkurentnost biljaka i nutritivnu vrijednost poljoprivrednih proizvoda. Taj utjecaj dodatno se pogoršava zbog trenutnih klimatskih promjena, osobito povećanja razine CO<sub>2</sub> u atmosferi (Hetherington i Woodward, 2003; Myers i sur., 2014).

Otvor i broj puči na površini fotosintetskih organa zajednički kontroliraju genetika i okolišni faktori kako bi se 'postavile' stope izmjene plinova u skladu s trenutnim uvjetima okoline (Hetherington i Woodward, 2003; Assmann i Jegla, 2016). Da bi sačuvale vodu, pustinjske

biljke, kao i borovi, često imaju svoje puči uvučene u stomatalne kripke koje su male komore ispod površine lista ili stabljike.



**Slika 11.** Fotografija uzoraka distribucije puči u *C. camphora*. (a, b). Rijetko je da se puči međusobno dodiruju; većina ih je raspoređena na pokožici lista pojedinačno. Međutim, ima mnogo puči čiji je raspored vrlo blizu jedno drugome i odvojenih samo jednim EC (epidermalna stanica), (označeno isprekidanim strelicama). (c, d) Grozdasti prikaz puči je označeni punim strelicama (preuzeto iz Genxuan Wang, 2006.)

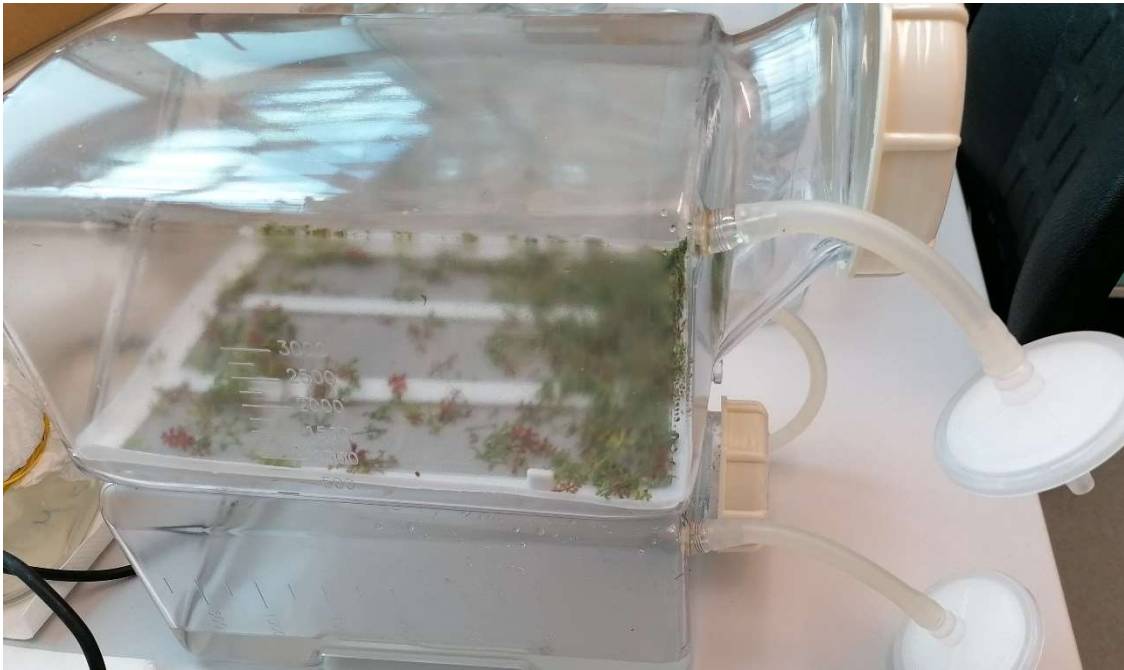
Puči se značajno razlikuju u raspodjeli, rasporedu, veličini i učestalosti među vrstama ili genotipovima unutar jedne vrste (Slika 11.). Obično su duge 20–50 µm i javljaju se u gustoći između 50 i 300 po mm<sup>2</sup>. Puči se mogu naći na stabljikama, listovima, cvjetovima i plodovima, ali ne i na korijenju. Na listovima puči mogu biti prisutne na obje površine (amfistomatski, npr. kod *Arabidopsis*) ili samo na jednoj površini (hipostomatski), kao kod većine drvenastih biljaka, uključujući i borovnicu. Međutim, topola i vrba su iznimke među drvenastim biljkama jer su amfistomatske. Puči obično potpuno izostaju s potopljenih listova vodenih biljaka (astomatski). Većina parazitskih biljaka često nema puči (He, Liang, 2018.).

Biljke stvaraju puči u organiziranim uzorcima. Kod trava, četinjača i nekih dikotiledona, puči se javljaju u paralelnim redovima, dok su kod listova s mrežastom nervaturom često 'nasumično' raspršene (He, Liang, 2018.).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Opis laboratorija

Istraživački dio ovog diplomskog rada proveden je u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS). Laboratorij je u potpunosti opremljen za uspješno provođenje istraživanja iz ovog područja znanstvenog rada, a posjeduje: laminarni stol/kabinet, autoklav, magnetna miješalica, pH metar, sterilizator, pincete, skalpeli, TIB/TIS – SETIS<sup>®</sup> sustav bioreaktora (Slika 12.), matični biljni materijal (matičnjak), prostor za aklimatizaciju te klima komoru s kontroliranim uvjetima potrebnim za razvoj *in vitro* biljaka u pojedinim fazama mikropropagacije.



**Slika 12.** SETIS<sup>™</sup> bioreaktorska jedinica (Izvor: Zita Bece)

U laboratoriju za kulturu tkiva *in vitro* u kulturi se održavaju mnoge voćne i druge biljne vrste poput: lijeske, paulovnije, maline, kupine, višnje, trešnje, ružmarina, divizme, ukrasnih grmova, borovnice, oraha, vegetativnih voćnih podloga, itd. (Slika 13.).





**Slika 13.** Biljni *in vitro* materijal borovnice na FAZOS-u (Izvor: Zita Bece, 2024.)

### 3.2. Cilj i postavljanje istraživanja

Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje utjecaja nanočestica silicija ( $\text{SiO}_2$ ) na anatomske značajke lista (veličina, broj i izgled puči) voćne vrste američke visokogrmolike borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u SETIS™ tekućem imerznom sustavu bioreaktora (Slika 12).

Samo istraživanje je postavljeno u sterilnim uvjetima laminarne komore (laboratorij za *in vitro*), gdje je pripremljen tekući hranjivi medij s različitim koncentracijama nanočestica silicijevog dioksida ( $\text{SiO}_2$ ). Inicijacija eksplantata obavljena je u TIB/TIS posude za biljni materijal.

Sva oprema, posuđe, pribor i medij korišten za izradu ovog diplomskog rada steriliziran je u vertikalnom Inko lab autoklavu u režimu 121 °C s trajanje od 20 minuta pri tlaku od 1,2 bara. Radni prostor laminarne komore je steriliziran sa 70 %-tnim etanolom i UV svjetlom u trajanju od 30 minuta.

Imerzni sustav bioreaktora SETIS™ se sastoji od fizički odvojenih posuda (komora) s biljnim materijalom i posuda s tekućim hranjivim medijem koji pomoću pneumatike i zadanog ciklusa povremeno potapa biljni materijal. Svaka je jedinica (bioreaktor), opremljena dodatnim ventilima s mikrofilterima (veličina pora 0,2  $\mu\text{m}$ ) za regulaciju tlaka i izmjenu plinova čime se postiže kontrolirano prozračivanje medija i komore s biljnim

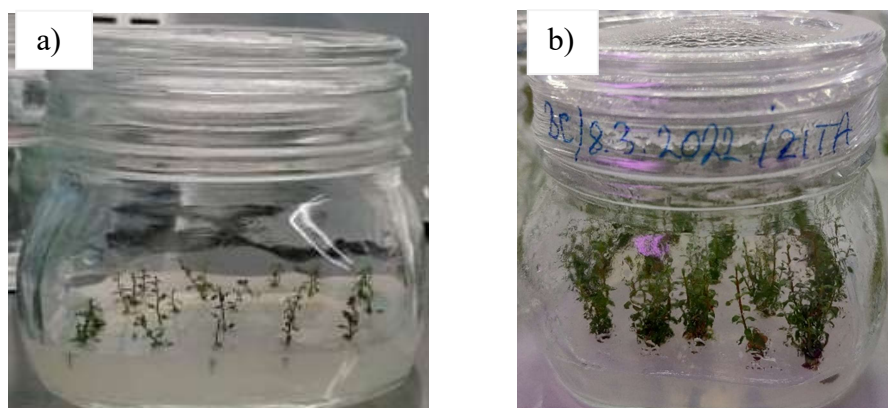
materijalom (Slika 14.) kako bi se spriječila akumulacija etilena i naknadna kontaminacija u sustavu (Bošnjak, 2022.).



**Slika 14.** Niz bioreaktorskih jedinica SETIS™ s biljnim materijalom (Izvor: <https://setis-systems.be/>)

### 3.3. Biljni materijal u istraživanju

Istraživanje je provedeno na voćnoj vrsti američkoj borovnici (*Vaccinium corymbosum* L.), koja je prethodno uvedena u *in vitro* kulturu biljnog tkiva. *In vitro* izdanci disecirani su na nodijalne eksplantate (Slika 15.) veličine 1 do 2 cm s dva do tri nodija (bočna pupa s listom), te potom preneseni u sterilni bioreaktor (posudu) za biljni materijal.



**Slika 15.** a.) Prikaz multiplicitiranih nodijalnih segmenata na WPM mediju – 0 dan, b.) nodijalni segmenti nakon 30 dana kulture (Izvor: Zita Bece)



### 3.4. Tretmani u istraživanju

U izradi ovog diplomskog rada korišten je gotovi hranjivi medij WPM (Lloyd i McCown, 1981.) formulacije, proizvođača Duchefa Biochemie (Nizozemska). Hranjivi medij sadržavao je mikro- i makroelemente koji su navedeni u tablici 2., uz dodatak 30 g/L šećera, 2 mg/L zeatina (citokinin) i pojedinih tretman nanočestica SiO<sub>2</sub>. pH medija podešen je na 5,0. Svaki bioreaktor sadržavao je oko 750 ml tekućeg hranjivog medija, a nanočestice SiO<sub>2</sub> dodane su direktno u tekući hranjivi medij prije autoklaviranja.

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

<b>Mikroelementi</b>	<b>mg/l</b>	<b>μM</b>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.25	1.00
FeNaEDTA	36.70	100.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	100.27
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	22.30	131.94
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	1.03
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.60	29.91
<b>Makroelementi</b>	<b>mg/l</b>	<b>mM</b>
CaCl <sub>2</sub>	72.50	0.65
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	471.26	2.35
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	1.25
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990.00	5.68
MgSO <sub>4</sub>	180.54	1.50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400.00	5.00

Tretmani su uključivali primjenu gotovih i sintetiziranih nanočestica silicijevog dioksida (SiO<sub>2</sub> nanopuder, veličina čestica 10 – 20 nm), a matična otopina nanočestica SiO<sub>2</sub> pripremljena je otapanjem i disperzijom pomoću DMSO (dimetil sulfoksida) i ultrazvučnog homogenizatora Hielcher UP400St.

Istraživanje je uključivalo postavljenje 2 tretmana s nanočesticama (Si I i Si II) + kontrolni tretman (K). Svaki tretman postavljen je u 3 repeticije (3 bioreaktora + 3 tretmana = 9 bioreaktora), a svaka posuda s biljnim materijalom sadržavala je 200 eksplantata borovnice (3 x 200 = 600 eksplantata po tretmanu). U tablici 3. detaljno su prikazane korištene koncentracije nano-SiO<sub>2</sub> u ovom istraživanju.

**Tablica 3.** Tretmani u istraživanju

Tretman	Koncentracija – repeticije
<b>K</b>	kontrola – 0 (bez nanočestica)
<b>Si I</b>	30 mg/L – nano-SiO <sub>2</sub>
<b>Si II</b>	75 mg/L – nano-SiO <sub>2</sub>

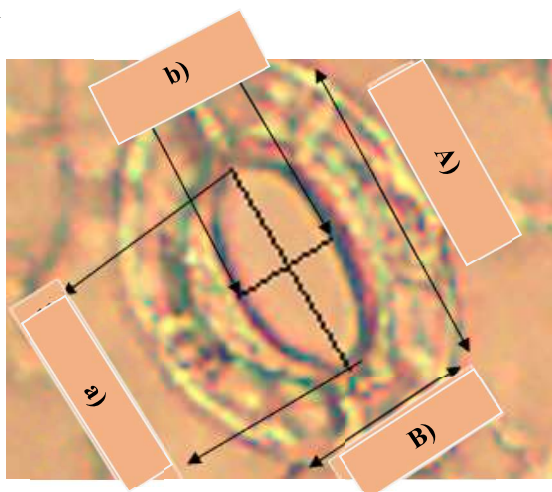
Po završetku postavljanja istraživanja svi bioreaktori postavljeni su u klima komoru u režim svjetlosti 16/8 (svjetlo/mrak) i temperaturu od oko  $23 \pm 1,5$  °C.

### 3.5. Mjerenja u istraživanju

Listovi s pučima pripremljeni su prema metodi Gao i sur. (2017.). Nakon 30 dana kulture sa svakog tretmana uzeto je 10 nasumično odabranih novih izdanaka borovnice, odnosno sa svakog izdanka je uzeto najmanje 10 listova koji su potopljeni u MES-KCl pufer te im je pomoću skalpela i pincete oguljena donja epiderma. Fragmenti epiderme su promatrani pod svjetlosnim mikroskopom i fotografirani digitalnom mikroskopskom kamerom (Slika 17.) uz analizu u programu Motic Images Plus 2.0ML. Mjerenja su obuhvaćala određivanje broja puči po površini epiderme lista ( $\text{mm}^2$ ) i dimenzija puči (dužina i širina puči i otvora porusa,  $\mu\text{m}$ ).

Mjerenja u istraživanju:

- Broj puči po površini epiderme ( $\text{mm}^2$ )
- Dimenzije puči (Slika 16.): dužina (A) i širina (B) puči i dužina (a) i širina otvora (b) porusa u  $\mu\text{m}$



**Slika 16.** Shematski prikaz mjerenih parametara dimenzija puči



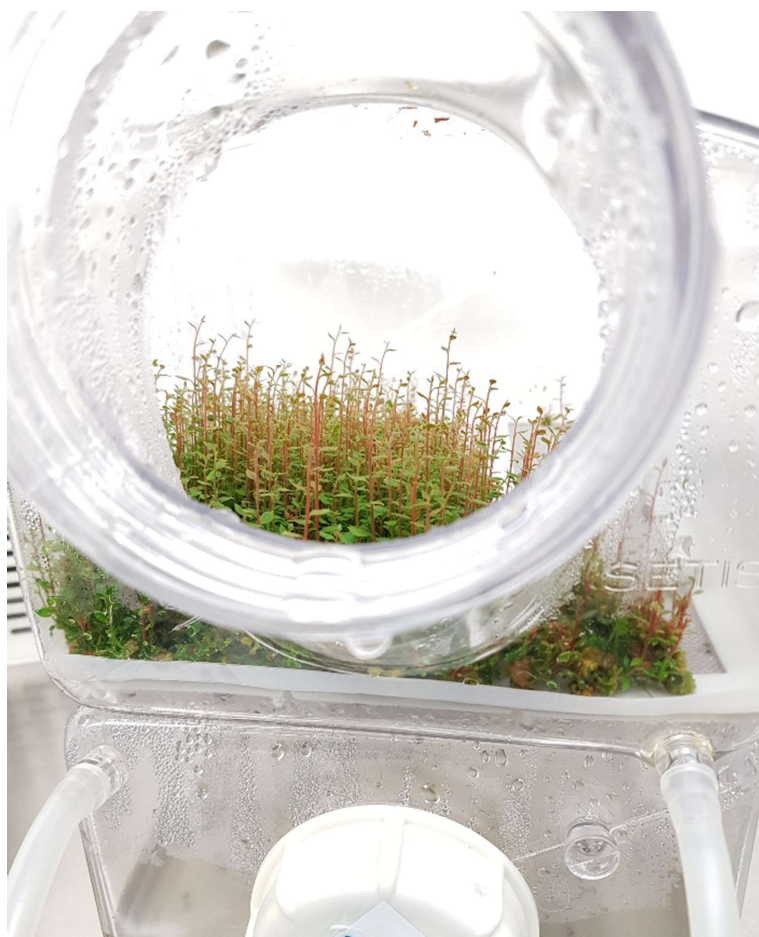
**Slika 17.** Promatranje fragmenata epiderme pod svjetlosnim mikroskopom i fotografiranje  
(Izvor: Zita Bece)

### **3.6. Statistička obrada podataka**

Podatci u ovom diplomskom radu analizirani su pomoću Microsoft Office Excel 2013. i SAS Software 9.3. statističkog paketa. Za statističku obradu korištena je analiza varijance, a razlike između srednjih vrijednosti tretmana utvrđene su pomoću Fisher LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. REZULTATI

Nakon 45 dana kulture svi tretmani uspjeli su inicirati dovoljno biomase za daljnju multiplikaciju, odnosno provođenje analiza i evaluaciju tretmana (Slika 18.). Tijekom mjerenja anatomskih značajki lista i evaluacije samih tretmana nije uočena kontaminacija ili stresni utjecaj hranjive podloge i/ili uvjeta klima komore.



**Slika 18.** Biomasa nakon 45 dana kulture (Izvor: Zita Bece)

U tablici 4. izneseni su rezultati mjerenja dimenzija puči i otvora porusa po primijenjenim tretmanima.

Prema tablici 4. na kontrolnom tretmanu (K) visina puči (A) po repeticijama kretala se u rasponu od 23,09 do 26,31, odnosno prosječno 24,70  $\mu\text{m}$ . Širina puči (B) kretala se u rasponu od 19,63 do 22,72, prosječno 21,18  $\mu\text{m}$ . Visina porusa (a) kretala se od 8,10 do 11,12, odnosno prosječno 9,61  $\mu\text{m}$ . Širina porusa na kontrolnom tretmanu (K) iznosila je 6,33 do 8,78, tj. prosječno 7,55  $\mu\text{m}$ .

**Tablica 4.** Dimenzije puči i otvora porusa na listovima borovnice po tretmanima i repeticijama ( $\mu\text{m}$ )

<i>Tretman</i>	<i>Repeticija</i>	<b>(A) Visina puči</b>	<b>Prosjek</b>	<b>(B) Širina puči</b>	<b>Prosjek</b>	<b>(a) Visina porusa</b>	<b>Prosjek</b>	<b>(b) Širina porusa</b>	<b>Prosjek</b>
<i>K</i>	1	23,09	24,70	19,63	21,18	8,10	9,61	6,33	7,55
<i>K</i>	2	26,31		22,72		11,12		8,78	
<i>Si I</i>	1	26,30	27,15	22,59	23,43	10,22	10,72	7,90	8,58
<i>Si I</i>	2	28,00		24,26		11,21		9,26	
<i>Si II</i>	1	27,06	26,55	23,16	22,18	10,90	10,24	8,10	7,68
<i>Si II</i>	2	26,04		21,20		9,59		7,27	

**Tablica 5.** Broj puči po tretmanima i repeticijama na listovima borovnice (po  $\text{mm}^2$ )

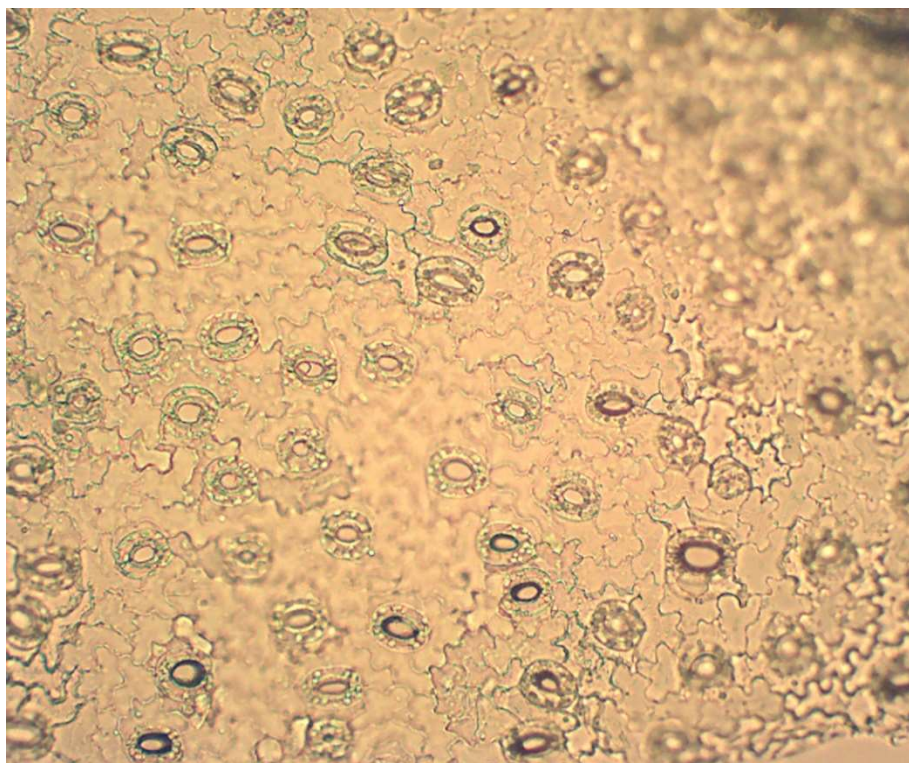
<i>Tretman</i>	<i>Repeticija</i>	<b>Broj puči</b>	<b>Prosječan broj puči po tretmanu (po <math>\text{mm}^2</math>)</b>	<b>Prosječan broj puči na razini pokusa (po <math>\text{mm}^2</math>)</b>
<i>K</i>	1	43,3	39,0	32,4
<i>K</i>	2	34,6		
<i>Si I</i>	1	31,2	28,9	
<i>Si I</i>	2	26,5		
<i>Si II</i>	1	25,0	29,5	
<i>Si II</i>	2	34,0		



Na tretmanu Si I, visina puči (A) po repeticijama kretala se u rasponu od 26,30 do 28,00 s prosječnom vrijednošću od 27,15  $\mu\text{m}$ . Širina puči (B) u ovom tretmanu kretala se od 22,59 do 24,26, odnosno prosječno 23,43  $\mu\text{m}$ . Visina porusa (a) bila je između 10,22 do 11,21 s prosjekom od 10,72  $\mu\text{m}$ . Širina porusa (b) kretala se u rasponu od 7,90 do 9,26, tj. prosječno 8,59  $\mu\text{m}$  (Tablica 4.).

Na tretmanu Si II (Tablica 4.), visina puči (A) po repeticijama kretala se u rasponu od 26,04 do 27,06, s prosjekom od 26,55  $\mu\text{m}$ . Širina puči (B) bila je od 21,20 do 23,16, odnosno prosječno 22,18  $\mu\text{m}$ . Visina porusa (a) kretala se između 9,59 i 10,90, s prosjekom 10,24  $\mu\text{m}$ , a širina porusa (b) od 7,27 do 8,10 u prosjeku 7,68  $\mu\text{m}$ .

U tablici 5. izneseni su rezultati broja puči po  $\text{mm}^2$  donje epiderme lista po primijenjenim tretmanima (Slika 19.). Prema tablici 5. broj puči po  $\text{mm}^2$  na kontrolnom tretmanu (K) kretao se u rasponu od 34,6 do 43,3 ili prosječno po tretmanu 39,0. Na tretmani Si I broj puči kretao se u rasponu od 26,5 do 31,2, odnosno prosječno 28,9. Na tretmanu Si II broj puči bio je između 25,0 do 34,0 s prosjekom od 29,5. Prosječan broj puči na razini cijelog pokusa po  $\text{mm}^2$  donje epiderme lista borovnice iznosio je 32,4 puči.



**Slika 19.** Originalni izgled uzorka za parametar broj puči po  $\text{mm}^2$  donje epiderme lista

*(Izvor: Zita Bece)*

## 5. RASPRAVA

Na razini cijelog pokusa nisu utvrđene statistički značajne razlike u dimenzijama puči (A i B) i otvoru porusa (a i b) te broju puči po mm<sup>2</sup> epiderme lista između kontrole i tretmana s nano silicijem (SiO<sub>2</sub>), (Tablica 6).

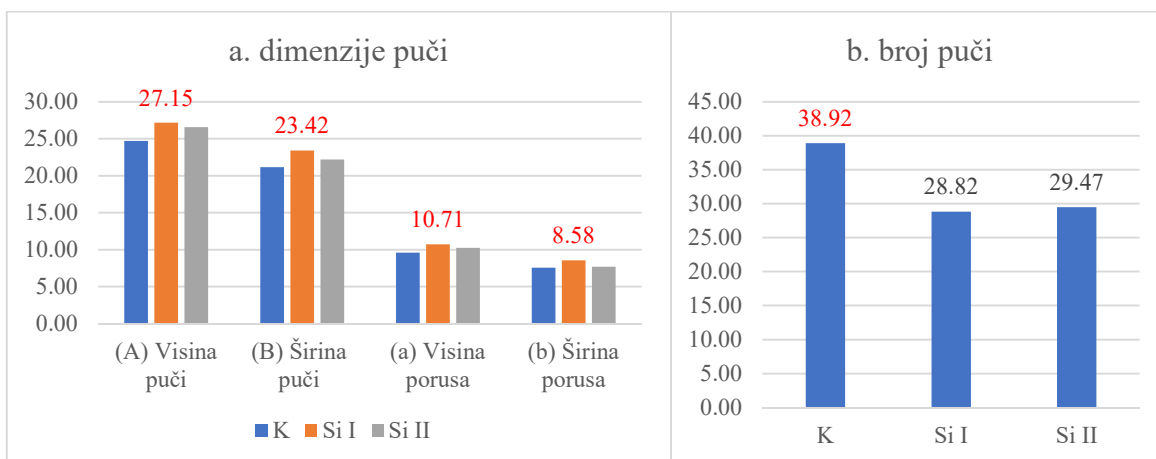
**Tablica 6.** Statističke razlike u dimenzijama puči i otvoru porusa po tretmanima u pokusu

<i>Tretman</i>	<i>(A) Visina puči (μm)</i>	<i>(B) Širina puči (μm)</i>	<i>(a) Visina porusa (μm)</i>	<i>(b) Širina porusa (μm)</i>	<i>Broj puči (mm<sup>2</sup>)</i>
<i>K</i>	24,70 <sup>A</sup>	21,17 <sup>A</sup>	9,61 <sup>A</sup>	7,55 <sup>A</sup>	38,92 <sup>A</sup>
<i>Si I</i>	27,15 <sup>A</sup>	23,42 <sup>A</sup>	10,71 <sup>A</sup>	8,58 <sup>A</sup>	28,82 <sup>A</sup>
<i>Si II</i>	26,55 <sup>A</sup>	22,18 <sup>A</sup>	10,24 <sup>A</sup>	7,68 <sup>A</sup>	29,47 <sup>A</sup>
<i>F - test</i>	1,37	0,94	0,31	0,44	2,14
<i>p</i>	0,3781	0,4813	0,7530	0,6812	0,2640

Prema grafikovima 1. ali i tablici 6. vidljivo je da su puči na tretmanu s nižom koncentracijom silicija od 30 mg/L (Si I) bile najvećih dimenzija u odnosu na kontrolu (K) i tretman s većom koncentracijom nano silicija (Si II – 75 mg/L). Tretman s višom koncentracijom silicija od 75 mg/L (Si II) također je razvio veće puči (A, B, a i b) u odnosu na kontrolni tretman (K). Primjena nano silicijevog dioksida (SiO<sub>2</sub>) ima značajan utjecaj na morfološke karakteristike listova (Sivanesan i Park, 2014.; Humbal i Pathak, 2023.). Nano SiO<sub>2</sub> može poboljšati strukturu i funkcionalnost staničnih stjenki, uključujući stanice puči, što rezultira promjenama u veličini puči i porusa. Osim toga, aplikacija SiO<sub>2</sub> može povećati broj puči na listovima, što poboljšava fotosintetsku aktivnost i učinkovitost korištenja vode u biljkama (Direkvandy i sur., 2024.; Liang i sur.,2023.; Du i sur., 2022.).

Direkvandy i sur. 2024., u svom istraživanju na pšenici (*Triticum aestivum* L.) iznose pozitivni utjecaj nanočestica SiO<sub>2</sub> koje su blago povećale broj puči i poboljšale fotosintetsku aktivnost, što je dovelo do bolje otpornosti biljaka na sušu i druge abiotičke stresove. Ova teza u našem istraživanju nije potvrđena, odnosno u našem istraživanju oba tretmana sa nano SiO<sub>2</sub> (Si I i Si II) nisu utjecala na povećanje broja puči po mm<sup>2</sup>. Isti autori navode da su nanočestice SiO<sub>2</sub> smanjuju veličinu puči i porusa na listovima pšenice, čime se poboljšava kontrola transpiracije i povećava učinkovitost korištenja vode u uvjetima suše. Manje puči

omogućuju bolju prilagodbu biljaka na stresne uvjete, smanjujući gubitak vode i poboljšavajući opstanak biljaka u nepovoljnim uvjetima (Direkvandy i sur. 2024.). Kontrastno, u našem istraživanju na svim tretmanima s nano SiO<sub>2</sub>, a posebice na tretmanu Si I (30 mg/L) primijećeno je blago povećanje (statistički nije značajno) svih parametara po pitanju dimenzija puči i otvora porusa (Grafikon 1.).



**Grafikon 1.** Grafički prikaz razlika između tretmana u a. dimenzije puči i b. broju puči u pokusu

Također, slične rezultate u smanjenju veličine i povećanju broja puči pod utjecajem nanočestice SiO<sub>2</sub> iznose Du i sur. 2022. na riži (*Oryza sativa* L.). Autori iznose kako je veći broj puči rezultirao povećanom fotosintetskom aktivnošću i boljom otpornošću na abiotičke stresove, dok je smanjena veličina puči pogodovala smanjenju gubitka vode.

Liang i sur. 2023. u istraživanju na pamuku (*Gossypium hirsutum* L.) iznose da je primjena nanočestica SiO<sub>2</sub> poboljšala regulaciju puči i fotosintetsku učinkovitost pod uvjetima stresa izazvanog niskim temperaturama i visoke koncentracije soli. Također utvrdili su da je primjena nano SiO<sub>2</sub> rezultirala smanjenjem veličine puči, dok je broj puči po jedinici površine ostao stabilan ili blago povećan, ovisno o koncentraciji nanočestica.

Navedena istraživanja ukazuju na pozitivni utjecaj nanočestica SiO<sub>2</sub> u poboljšanju biljnih karakteristika, odnosno otpornosti biljaka na različite stresove *ex vitro*. U našem istraživanju nismo utvrdili značajne razlike između kontrolnog tretmana i tretmana s nanočesticama po pitanju dimenzija puči ali i broja puči na listovima borovnice *in vitro*. Iako se radi o imerznom sustavu koji koristi tekuću hranjivu podlogu, odnosno medij, nanočestice SiO<sub>2</sub> nisu značajno doprinijele u smanjenju dimenzija puči, odnosno povećanju broja puči po mm<sup>2</sup> epiderme listova borovnice. Oba tretmana s nanočesticama SiO<sub>2</sub> rezultirala su s većim



pučima (veličina i širina puči i porusa) i manjim brojem puči po mm<sup>2</sup> u odnosu na kontrolni tretman (Tablica 6., Grafikon 1).

Istraživanja o direktnom utjecaju nanočestica SiO<sub>2</sub> u kulturi biljnog tkiva na anatomske značajke listova (dimenzije i broj puči) *in vivo* biljaka vrlo su oskudna. Pregledom recentnih i dostupnih istraživanja nije utvrđen niti jedan znanstveno-istraživački rad ciljan na ovu temu. Pojedine studije ukazuju da postoje određeni utjecaju nanočestica SiO<sub>2</sub> na ponašanje puči (fiziologiju), međutim specifična ili slična istraživanja usmjerena isključivo na ove parametre (dimenzije i broj puči) *in vitro* još uvijek nisu dostupna.

U znanstvenim radovima o primjeni nanočestica SiO<sub>2</sub> u kulturi biljnog tkiva *in vitro* uglavnom se istražuje utjecaj ovih nanočestica na povećanje otpornost biljaka na bolesti (El-Shetehy i sur., 2021.) unosu, transportu, distribuciji ili bio-učincima nanočestica (Le i sur., 2014.) ili učinku na razvoj eksplantata i korijena *in vitro* biljaka (El-Kady i sur., 2017.).

El-Shetehy i sur., (2021.) u svom istraživanju utvrdili su da *in vitro* biljke Arabidopsisa pod tretmanom s nanočesticama nepotpuno zatvaraju puči, a razlog leži uslijed prisutnosti nanočestica smještenih između stanica zapornica. Ovi rezultati upućuju na izravan utjecaj nanočestica SiO<sub>2</sub> na funkcioniranje samih puči. Iako je istraživanje prvenstveno usmjereno na otpornost na bolesti i fiziološke učinke, dobivene su spoznaje o akumulaciji i fiziologiji rada puči na tretmanima s nanočesticama silicijevog dioksida. Le i sur., (2014.) pružaju nam uvid u fiziološke učinke ovih nanočestica, koji se neizravno mogu odnositi i na karakteristike samih puči. Istraživanje govori o tome kako nanočestice SiO<sub>2</sub> mogu utjecati na rast i razvoj *in vitro* biljaka pamuka, te iznose posljedičnu mogućnost utjecaja i na gustoću (broj) i veličinu (dimenzije) puči, iako konkretna mjerenja nisu iznesena u rezultatima. El-Kady i sur., (2017.) na *in vitro* eksplantatima banane usredotočeni su na parametre rasta i razvoja korijena i izdanaka. U ovom istraživanju nema podataka o dimenzijama ili broju puči, ali studija implicira da bi fiziološke promjene izazvane nanočesticama SiO<sub>2</sub> mogle neizravno utjecati na rad puči kroz poboljšani rast biljaka i reakciju na stresne uvjete.

Slijedom iznesenog, nanočestice SiO<sub>2</sub> pokazuju niz korisnih učinaka u kulturi biljnog tkiva *in vitro*, uključujući poboljšani rast eksplantata, povećanu otpornost na stres i smanjenu kontaminaciju.

Rezultati dobiveni u našem istraživanju sugeriraju na mogućnost utjecaja prvenstveno niže koncentracije nanočestica SiO<sub>2</sub> od 30 mg/L, ali i veće od 75 mg/L na anatomske značajke puči (dimenzije puči i otvora porusa) listova borovnice u imerznom sustavu bioreaktora.

Biljni materijal na kraju ciklusa razvio je idealnu biomasu te nije pokazao znakove stresa, vitifikacije ili negativnog utjecaja primijenjenih koncentracija nanočestica. Vizualnom analizom utvrđena je i veća visina te broj izdanaka koji su razvili više zelenijih listova u odnosu na kontrolni tretman (Slika 20.). Međutim, utjecaj primijenjenih koncentracija nanočestica SiO<sub>2</sub> na razvoj većeg broja puči po mm<sup>2</sup> epiderme listova eksplantata borovnice u tekućem imerznom sustavu nije potvrđen.

Pretpostavka je da nanočestice SiO<sub>2</sub> u obje koncentracije (30 i 75 mg/L) pozitivno utječu na anatomske karakteristike puči jer su *in vitro* izdanci na oba tretmana razvili veće i krupnije puči u odnosu na kontrolni tretman bez nanočestica. Pogotovo ukoliko se radi o tekućem hranjivom mediju (TIB/TIS sustav bioreaktora) gdje prevladavaju okolišni uvjeti visoke koncentracije vlage koja može dovesti do negativne fiziološke pojave tzv. vitifikacije ili hiperhidriranosti biljnog tkiva koja u našem istraživanju nije zapažena na ovim tretmanima.

Pretpostavka je da su primijenjene nanočestice pozitivno utjecale i na razvoj kutikule, odnosno epiderme ali i stanica mezofila (spužvasti i palisadni parenhim) listova borovnice. Izdanci na kontrolnom tretmanu (K) rezultirali su s 30 % vitificiranih izdanaka, dok na tretmanima sa nanočesticama vitifikacija je bila minimalna samo pri bazi, odnosno kalusu izdanka. Za potvrdu ove pretpostavke bilo bi potrebno obaviti histološke analize tkiva lista.

Ovi rezultati naglašavaju potencijal i vrijednost primjene nanočestica SiO<sub>2</sub> u biljnoj biotehnologiji, posebice na poboljšanje učinkovitosti ishoda *in vitro* metoda razmnožavanja u tekućem imerznom sustavu bioreaktora. Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti istraživanju drugih koncentracija te samih mehanizama na kojima se temelje izneseni učinci ali i optimizaciji njihove primjene na različitim drugim biljnim, odnosno voćnim vrstama.



**Slika 20.** Izgled *in vitro* biljaka borovnice unutar bioreaktorske posude na kontrolnom tretmanu (K) i tretmanu (Si I) s nanočesticama SiO<sub>2</sub> (Izvor: Bošnjak D.)

## 6. ZAKLJUČAK

Mikropropagacija borovnice predstavlja jedan od ključnih modela u komercijalnoj proizvodnji ove voćne vrste, odnosno ovom metodom vrlo brzo i masovno proizvodimo visokokvalitetni i fitosanitarno ispravnih sadni materijal. Uvođenje nanobiotehnologije u kombinaciji s tekućim imerznim (TIB/TIS) sustavom predstavlja suvremeni pristup koji dodatno unapređuje proces mikropropagacije. Istraživački dio ovog diplomskog rada proveden je u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS).

Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje utjecaja nanočestica silicijevog dioksida ( $\text{SiO}_2$ ) na anatomske značajke lista (veličina, broj i izgled puči) borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u SETIS<sup>TM</sup> tekućem imerznom sustavu bioreaktora.

Na osnovu dobivenih rezultata u ovom diplomskom radu zaključujemo sljedeće:

- Na razini cijelog pokusa nisu utvrđene statistički značajne razlike u dimenzijama puči i otvoru porusa ( $\mu\text{m}$ ) te broju puči po  $\text{mm}^2$  epiderme lista između kontrole i tretmana s nanočesticama  $\text{SiO}_2$ .
- Iako statistički razlike nisu bile značajne, puči na tretmanima s nanočesticama, a posebice na tretmanu s nižom koncentracijom nanočestica  $\text{SiO}_2$  od 30 mg/L (Si I) rezultirale su većim dimenzijama i otvorom porusa u odnosu na kontrolni tretman (K).
- Rezultati dobiveni u našem istraživanju sugeriraju na mogućnost utjecaja prvenstveno niže koncentracije nanočestica  $\text{SiO}_2$  od 30 mg/L, ali i veće od 75 mg/L na anatomske značajke puči (dimenzije puči i otvora porusa) listova borovnice u imerznom sustavu bioreaktora.
- Biljni materijal na kraju ciklusa (45 dana) razvio je idealnu biomasu te nije pokazao znakove stresa, vitifikacije ili negativnog utjecaja primijenjenih koncentracija nanočestica  $\text{SiO}_2$  na oba tretmana.
- Vizualnom analizom utvrđena je i veća visina te broj izdanaka na tretmanu s nanočesticama koji su razvili više zelenijih listova u odnosu na kontrolni tretman.
- Utjecaj primijenjenih koncentracija nanočestica  $\text{SiO}_2$  na razvoj većeg broja puči po  $\text{mm}^2$  epiderme listova eksplantata borovnice u tekućem imerznom sustavu nije potvrđen.

- Nanočestice SiO<sub>2</sub> u obje koncentracije (30 i 75 mg/L) su pozitivno utjecale na anatomske karakteristike puči jer su *in vitro* izdanci na oba tretmana razvili veće i krupnije puči u odnosu na kontrolni tretman bez nanočestica.
- Sugeriramo i na može bitni utjecaj primijenjenih nanočestice na pozitivni razvoj parametara kutikule, odnosno epiderme ali i stanica mezofila (spužvasti i palisadni parenhim) listova borovnice.
- Izdanci na kontrolnom tretmanu (K) rezultirali su s 30 % vitrificiranih izdanaka, dok na tretmanima sa nanočesticama vitrifikacija je bila minimalna samo pri bazi eksplantata, odnosno kalusu izdanka. Za potvrdu ove pretpostavke bilo bi potrebno obaviti histološke analize tkiva lista.
- Pregledom recentnih i dostupnih istraživanja nije utvrđen niti jedan znanstveno-istraživački rad ciljan na ovu temu. Pojedine studije ukazuju da postoje određeni utjecaju nanočestica SiO<sub>2</sub> na ponašanje puči (fiziologiju), međutim specifična ili slična istraživanja usmjerena isključivo na ove parametre (dimenzije i broj puči) *in vitro* još uvijek nisu dostupna.
- Dobiveni rezultati našeg istraživanja naglašavaju potencijal i vrijednost primjene nanočestica SiO<sub>2</sub> u biljnoj biotehnologiji, posebice na poboljšanje učinkovitosti ishoda *in vitro* metoda razmnožavanja u tekućem imerznom sustavu bioreaktora.
- Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti ispitivanju drugih koncentracija te samih mehanizama na kojima se temelje izneseni učinci ali i optimizaciji njihove primjene na različitim drugim biljnim, odnosno voćnim vrstama.

## 7. LITERATURA

1. Agustinah, W., Sarkar, D., Woods, F., Shetty, K. (2016.): Apple and blueberry synergies for designing bioactive ingredients for the management of early stages of type 2 diabetes. *Journal of food quality*, 39(4), 370-382.
2. Amsbury, S. , Hunt, L., Elhaddad, N., Baillie, A., Lundgren, M., Verhertbruggen, Y., Gray, J.E. (2016.): Stomatal function requires pectin de-methyl-esterification of the guard cell wall. *Current Biology*, 26(21), 2899-2906.
3. Assmann, S.M., Jegla, T. (2016.): Guard cell sensory systems: recent insights on stomatal responses to light, abscisic acid, and CO<sub>2</sub>. *Current opinion in plant biology*, 33, 157-167.
4. Asmar, S.A., Castro, E.M., Pasqual, M., Pereira, F.J., Soares, J.D.R. (2013): Changes in leaf anatomy and photosynthesis of micropropagated banana plantlets under different silicon sources. *Scientia Horticulturae*, 161, 328-332.
5. Bao-Shan, L., shao-qi, D., Chun-Hui, L., Li-Jun, F., Shu-Chun, Q., Min, Y. (2004.): Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings. *Journal of Forestry research*, 15, 138-140.
6. Beruto, M., Curir, P., Debergh, P. (1999.): Influence of agar on in vitro cultures: II. Biological performance of *Ranunculus* on media solidified with three different agar brands. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35, 94-101.
7. Bošnjak, D. (2022.): Optimizacija mikropropagacije borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) primjenom nanobiotehnologije u tekućem imerznom (TIB/TIS) sustavu bioreaktora (Doctoral dissertation, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek. Department of Plant Production and Biotechnology).
8. Braga, F.T., Nunes, C.F., Favero, A.C., Pasqual, M., Carvalho, J.G., Castro, E.M. (2009.): Anatomical characteristics of the strawberry seedlings micropropagated using different sources of silicon. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 44, 128–132.
9. Brown, D.C.W., Thorpe, T.A. (1995.): Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 409-415.
10. Camp, W.H. (1945.): The North American blueberries with notes on other groups of *Vacciniaceae*.

11. Cherif, M., Belanger, R.R. (1992.): Use of potassium silicate amendments in recirculating nutrient solutions to suppress *Pythium ultimum* on long English cucumber.
12. Dakora, F.D., Nelwamondo, A. (2003.): Silicon nutrition promotes root growth and tissue mechanical strength in symbiotic cowpea. *Funct Plant Biol* 30: 947–953.
13. de Klerk, G.J., Wijnhoven, F. (2005.): Water retention capacity of tissue-cultured plants: performance of leaves from in vitro germinated mungbean seedlings. *Propagation of ornamental plants*, 5(1), 14-8.
14. Debnath, S.C. (2009.): A scale-up system for lowbush blueberry micropropagation using a bioreactor. *HortScience*, 44(7), 1962-1966.
15. Direkvandy, S., Eisvand, H.R., Azizi, K., Akbarpour, O., Smith, D.L. (2024.): Mitigation impact of SiO<sub>2</sub> nanoparticles and mycorrhiza on wheat growth and yield under late-season drought stress. *Cereal Research Communications*, 1-12.
16. Doblin, M.S. , Pettolino, F., Bacic, A. (2010.): Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Functional Plant Biology*, 37(5), 357-381.
17. Du, J. , Liu, B., Zhao, T., Xu, X., Lin, H., Ji, Y., Ding, X. (2022.): Silica nanoparticles protect rice against biotic and abiotic stresses. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 197.
18. El-Kady, M.E., El-Boray, M.S., Shalan, A.M., Mohamed, L.M. (2017.): Effect of silicon dioxide nanoparticles on growth improvement of banana shoots in vitro within rooting stage. *Journal of Plant Production*, 8(9), 913-916.
19. El-Shetehy, M., Moradi, A., Maceroni, M., Reinhardt, D., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., Schwab, F. (2021.): Silica nanoparticles enhance disease resistance in *Arabidopsis* plants. *Nature Nanotechnology*, 16(3), 344-353.
20. Epstein, E. (1994.): The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 11-17.
21. Epstein, E. (1999.): Silicon. *Annual review of plant biology*, 50(1), 641-664.
22. Flores, F.P. , Singh, R.K., Kerr, W.L., Pegg, R.B., Kong, F. (2013.): Antioxidant and enzyme inhibitory activities of blueberry anthocyanins prepared using different solvents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(18), 4441-4447.

23. Freitas, P.S. , Andrade, S.F.D., Maistro, E.L. (2008.): Evaluation of the in vivo mutagenic potential of hydroalcoholic extracts of the northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. Ericales, Ericaceae) on peripheral blood cells of Swiss mice (*Mus musculus* Rodentia, Muridae). *Genetics and Molecular Biology*, 31, 555-560.
24. Gao, H. , Xia, X., An, L., Xin, X., Liang, Y. (2017.): Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO<sub>3</sub> and its associated mechanism during in vitro culture. *Plant Science*, 254, 1-11.
25. Gillman, J.H., Zlesak, D.C., Smith, J.A. (2003.): Applications of Potassium Silicate Decrease Black Spot Infection in *Rosa hybrida* Meipelta'(Fuschia Meidiland™). *HortScience*, 38(6), 1144-1147.
26. Hetherington, A.M., Woodward, F.I. (2003.): The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(6951), 901-908.
27. Howell, A.B. (2008., July): Update on health benefits of cranberry and blueberry. In IX International Vaccinium Symposium 810 (pp. 779-785).
28. Humbal, A., Pathak, B. (2023.): Harnessing nanoparticle-mediated elicitation in plant tissue culture: a promising approach for secondary metabolite production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 155(2), 385-402.
29. Huntley, A.L. (2009.): The health benefits of berry flavonoids for menopausal women: cardiovascular disease, cancer and cognition. *Maturitas*, 63(4), 297-301.
30. Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., Ullah, I. (2012.): Plant tissue culture: current status and opportunities. *Recent advances in plant in vitro culture*, 6(10), 1-28.
31. Jain, D., Daima, H.K., Kachhwaha, S., Kothari, S.L. (2009.): Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. *Digest journal of nanomaterials and biostructures*, 4(3), 557-563.
32. Jingjing He, Yun-Kuan Liang, (February 2018.): Stomata
33. Jones, L., Milne, J.L., Ashford, D., McQueen-Mason, S.J. (2003.): Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11783-11788.

34. Khanal, R.C., Howard, L.R., Wilkes, S.E., Rogers, T.J., Prior, R.L. (2012.): Effect of dietary blueberry pomace on selected metabolic factors associated with high fructose feeding in growing Sprague–Dawley rats. *Journal of medicinal food*, 15(9), 802-810.
35. Kim, D.H., Gopal, J., Sivanesan, I. (2017.): Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC advances*, 7(58), 36492-36505.
36. Kron, K.A., Powell, E.A., Luteyn, J.L. (2002.): Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (Vaccinieae, Ericaceae) based on sequence data from matK and nuclear ribosomal ITS regions, with comments on the placement of Satyria. *American Journal of Botany*, 89(2), 327-336.
37. Lawson, T., Blatt, M.R. (2014.): Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant physiology*, 164(4), 1556-1570.
38. Le, V.N., Rui, Y., Gui, X., Li, X., Liu, S., Han, Y. (2014.): Uptake, transport, distribution and bio-effects of SiO<sub>2</sub> nanoparticles in Bt-transgenic cotton. *Journal of nanobiotechnology*, 12, 1-15.
39. Liang, Y., Liu, H., Fu, Y., Li, P., Li, S., Gao, Y. (2023.): Regulatory effects of silicon nanoparticles on the growth and photosynthesis of cotton seedlings under salt and low-temperature dual stress. *BMC Plant Biology*, 23(1), 504.
40. Lim, M.Y., Lee, E.J., Jana, S., Sivanesan, I., Jeong, B.R. (2012.): Effect of potassium silicate on growth and leaf epidermal characteristics of begonia and pansy grown in vitro. *Horticultural Science & Technology*, 30(5), 579-585.
41. Liu, C., Callow, P., Rowland, L.J., Hancock, J.F., Song, G.Q. (2010.): Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern highbush blueberry cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103, 137-144.
42. Lloyd, G., McCown, B. (1980.): Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture.
43. Locarno, M., Fochi, C.G., Paiva, P.D.D.O. (2011.): Influence of silicate fertilization on chlorophylls of rose leaves. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 287-290.
44. Louis, X.L., Thandapilly, S.J., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M., Aloud, B.M., Raj, P., Netticadan, T. (2014.): Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. *Food & function*, 5(8), 1785-1794.



45. Luby, J.J., Ballington, J.R., Draper, A.D., Pliszka, K., Austin, M.E. (1991.): Blueberries and cranberries (*Vaccinium*). Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops 290, 393-458.
46. Lyrene, P. (1978.): Blueberry callus and shoot tip culture. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 91, 171–172.
47. Lyrene, P.M., Vorsa, N., Ballington, J.R. (2003.): Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. Euphytica, 133, 27-36.
48. Lyrene, P.M. (1980.): Micropropagation of rabbiteye blueberries. HortScience 15, 80–81.
49. McLeay, Y., Barnes, M.J., Mundel, T., Hurst, S.M., Hurst, R.D., Stannard, S.R. (2012.): Effect of New Zealand blueberry consumption on recovery from eccentric exercise-induced muscle damage. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 9(1), 19.
50. Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., He, S.Y. (2006.): Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. Cell, 126(5), 969-980.
51. Michalska, A., Łysiak, G. (2015.): Bioactive compounds of blueberries: Post-harvest factors influencing the nutritional value of products. International journal of molecular sciences, 16(8), 18642-18663.
52. Ming, D.F., Pei, Z.F., Naeem, M.S., Gong, H.J., Zhou, W.J. (2012.): Silicon alleviates PEG-induced water-deficit stresses in upland rice seedlings by enhancing osmotic adjustment. J. Agron. Crop Sci. 198, 14–26.
53. Murashige, T., Skoog, F. (1962.): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3).
54. Myers, S.S., Zanobetti, A., Kloog, I., Huybers, P., Leakey, A.D., Bloom, A.J., Usui, Y. (2014.): Increasing CO<sub>2</sub> threatens human nutrition. Nature, 510(7503), 139-142.
55. Neto, C.C. (2007.): Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. Molecular nutrition & food research, 51(6), 652-664.
56. Neto, C.C. (2007.): Cranberry and its phytochemicals: a review of in vitro anticancer studies. The Journal of nutrition, 137(1), 186S-193S.

57. Neto, C.C., Amoroso, J. W., Liberty, A. M. (2008.): Anticancer activities of cranberry phytochemicals: an update. *Molecular nutrition & food research*, 52(S1), S18-S27.
58. Patel, S. (2014.): Blueberry as functional food and dietary supplement: The natural way to ensure holistic health. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 7(2), 133-143.
59. Purgar, D.D., Šindrak, Z., Mihelj, D., Voća, S., Duralija, B. (2007.): Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj. *Pomologia Croatica*, 13(4), 219-228.
60. Rafi, M.M., Epstein, E., Falk, R.H. (1997.): Silicon deprivation causes physical abnormalities in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of plant physiology*, 151(4), 497-501.
61. Raschke, K. (1975.): Stomatal action.
62. Raven, J.A. (2002.): Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist*, 153(3), 371-386.
63. Reed, B.M., Abdelnour-Esquivel, A. (1991.): The use of zeatin to initiate in vitro cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience*, 26(10), 1320-1322.
64. Ruzsala, E.M., Beerling, D.J., Franks, P.J., Chater, C., Casson, S.A., Gray, J.E., Hetherington, A.M. (2011.): Land plants acquired active stomatal control early in their evolutionary history. *Current biology*, 21(12), 1030-1035.
65. Ruttkay-Nedecky, B., Krystofova, O., Nejd, L., Adam, V. (2017.): Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. *Journal of nanobiotechnology*, 15, 1-19.
66. Ružić, D., Vujović, T., Libiakova, G., Cerović, R., Gajdošova, A. (2012.): Micropropagation in vitro of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of berry research*, 2(2), 97-103.
67. Santelia, D., Lawson, T. (2016.): Rethinking guard cell metabolism. *Plant Physiology*, 172(3), 1371-1392.
68. Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S., Heber, D. (2006.): Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(25), 9329-9339.

69. Shetty, R., Jensen, B., Shetty, N.P., Hansen, M., Hansen, C.W., Starkey, K.R., Jørgensen, H.J.L. (2012.): Silicon induced resistance against powdery mildew of roses caused by *Podosphaera pannosa*. *Plant pathology*, 61(1), 120-131.
70. Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H. (2013.): Role of nano-SiO<sub>2</sub> in germination of.
71. Sivanesan, I., Park, S.W. (2014.): The role of silicon in plant tissue culture. *Frontiers in plant science*, 5, 571.
72. Song, G.Q., Sink, K.C. (2004.): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Plant Cell Reports*, 23, 475-484.
73. Stamatakis, A., Papadantonakis, N., Savvas, D., Lydakis-Simantiris, N., Kefalas, P. (2003.): Effects of silicon and salinity on fruit yield and quality of tomato grown hydroponically. In *International Symposium on Managing Greenhouse Crops in Saline Environment 609* (pp. 141-147).
74. Strik, B.C., Yarborough, D. (2005.): Blueberry production trends in North America, 1992 to 2003, and predictions for growth.
75. Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Kunitake, H. (2008.): Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119(1), 72-74.
76. Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Chauhan, D.K., Dubey, N.K., Prasad, R. (2016.): Silicon as a beneficial element to combat the adverse effect of drought in agricultural crops. In: Ahmad P, editor. *Water stress and crop plants: A sustainable approach*. Chichester: Wiley Blackwell. pp. 682–694.
77. Thorpe, T.A. (2007.): History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology*, 37, 169-180.
78. Wang, P., Lombi, E., Zhao, F.J., Kopittke, P.M. (2016.): Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends in plant science*, 21(8), 699-712.
79. Wolfe, D.E., Eck, P., Chin, C.K. (1983.): Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry.

### **Internetski izvori:**

80. [www.grandflora.stores.jpg](http://www.grandflora.stores.jpg)
81. <https://blueberriesconsulting.com/en/los-movimientos-en-rankings-top-10-de-la-industria-del-arandano/>
82. <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.cabidigitallibrary.org%2Fdoi%2Ffull%2F10.1079%2Fcabicompendium.56000&psig=AOvVaw2aAWHi3yZ4nguzhXYcS3wK&ust=1725291835110000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBQQjRxqFwoTCPiSj4qLoogDFQAAAAAdAAAAABAE>
83. <https://www.herbazest.com/herbs/blueberry>
84. [www.airellesdesfreres.com](http://www.airellesdesfreres.com)
85. <https://images.app.goo.gl/qNTw83vs3VoEf72i8>
86. [https://www.researchgate.net/figure/Blueberry-Duke-in-vitro-culture-in-Plantform-bioreactor-a-a-500-ml-WPM-1-mg-l\\_fig1\\_337950659](https://www.researchgate.net/figure/Blueberry-Duke-in-vitro-culture-in-Plantform-bioreactor-a-a-500-ml-WPM-1-mg-l_fig1_337950659)
87. [https://www.researchgate.net/figure/Different-routes-for-the-interaction-and-transport-of-SiNPs-into-the-plant-system-are\\_fig2\\_361862395](https://www.researchgate.net/figure/Different-routes-for-the-interaction-and-transport-of-SiNPs-into-the-plant-system-are_fig2_361862395)
88. [https://www.researchgate.net/figure/Effect-of-nSiO2-on-seeding-growth-of-tomato\\_fig2\\_260010447](https://www.researchgate.net/figure/Effect-of-nSiO2-on-seeding-growth-of-tomato_fig2_260010447)
89. <https://plantstomata.wordpress.com/2018/12/04/stomata-6/>
90. [https://www.researchgate.net/figure/Photo-of-stomata-distribution-patterns-in-C-camphora-a-b-Rare-stomata-contact-each\\_fig1\\_227068101](https://www.researchgate.net/figure/Photo-of-stomata-distribution-patterns-in-C-camphora-a-b-Rare-stomata-contact-each_fig1_227068101)
91. <https://setis-systems.be/about/testimonials>

## 8. SAŽETAK

Istraživački dio ovog diplomskog rada proveden je u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS). Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje utjecaja nanočestica silicijevog dioksida ( $\text{SiO}_2$ ) na anatomske značajke lista (veličina, broj i izgled puči) borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u SETIS™ tekućem imerznom sustavu bioreaktora. Iako statistički razlike nisu bile značajne, puči na tretmanima s nanočesticama, a posebice na tretmanu s nižom koncentracijom nanočestica  $\text{SiO}_2$  od 30 mg/L rezultirale su većim dimenzijama i otvorom porusa u odnosu na kontrolni tretman. Rezultati sugeriraju na mogućnost utjecaja prvenstveno niže koncentracije nanočestica  $\text{SiO}_2$  od 30 mg/L, ali i veće od 75 mg/L na anatomske značajke puči (dimenzije puči i otvora porusa) listova borovnice u imerznom sustavu bioreaktora. Nanočestice  $\text{SiO}_2$  u obje koncentracije (30 i 75 mg/L) su pozitivno utjecale na anatomske karakteristike puči jer su *in vitro* izdanci na oba tretmana razvili veće i krupnije puči u odnosu na kontrolni tretman bez nanočestica. Biljni materijal na kraju ciklusa (45 dana) razvio je idealnu biomasu te nije pokazao znakove stresa, jake vitrifikacije ili negativnog utjecaja primijenjenih koncentracija nanočestica  $\text{SiO}_2$ . Vizualnom analizom utvrđena je i veća visina te broj izdanaka na tretmanima s nanočesticama koji su razvili više zelenijih listova u odnosu na kontrolni tretman. Utjecaj primijenjenih koncentracija nanočestica  $\text{SiO}_2$  na razvoj većeg broja puči po  $\text{mm}^2$  epiderme listova eksplantata borovnice u tekućem imerznom sustavu nije potvrđen. Dobiveni rezultati našeg istraživanja naglašavaju potencijal i vrijednost primjene nanočestica  $\text{SiO}_2$  u biljnoj biotehnologiji, posebice na poboljšanje učinkovitosti ishoda *in vitro* metoda razmnožavanja u tekućem imerznom sustavu bioreaktora. Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti ispitivanju drugih koncentracija nanočestica te samih mehanizama na kojima se temelje izneseni učinci ali i optimizaciji njihove primjene na različitim drugim biljnim, odnosno voćnim vrstama.

## 9. SUMMARY

The research component of this thesis was conducted in the Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Pomology, Viticulture, and Enology (Pomology Laboratory) at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek (FAZOS). The aim of this thesis was to examine the effects of silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>) nanoparticles on the anatomical characteristics of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) leaves, specifically the size and number of stomata, within the SETIS™ liquid immersion bioreactor system. Although the statistical differences were not significant, stomata in treatments with nanoparticles, especially with the lower concentration of SiO<sub>2</sub> nanoparticles (30 mg/L), exhibited larger dimensions and pore openings compared to the control treatment. The results suggest a potential effect, primarily of the lower concentration (30 mg/L), but also of the higher concentration (75 mg/L), of SiO<sub>2</sub> nanoparticles on the anatomical features of stomata (size and pore openings) in blueberry leaves grown in the immersion bioreactor system. SiO<sub>2</sub> nanoparticles, at both concentrations (30 and 75 mg/L), positively influenced the anatomical characteristics of stomata, as *in vitro* shoots in both treatments developed larger and more robust stomata compared to the control treatment without nanoparticles. By the end of the 45-day cycle, the plant material had developed an ideal biomass and showed no signs of stress, severe vitrification, or any negative effects from the applied concentrations of SiO<sub>2</sub> nanoparticles. Visual analysis also revealed greater shoot height and an increased number of shoots in nanoparticle-treated plants, which developed more and greener leaves compared to the control treatment. The effect of the applied SiO<sub>2</sub> nanoparticle concentrations on the development of a greater number of stomata per mm<sup>2</sup> of epidermal tissue in blueberry explants in the liquid immersion system was not confirmed. The results of our research emphasize the potential and value of applying SiO<sub>2</sub> nanoparticles in plant biotechnology, particularly in improving the efficiency of *in vitro* propagation methods within the liquid immersion bioreactor system. Future research should focus on testing other nanoparticle concentrations and exploring the mechanisms underlying the observed effects, as well as optimizing their application to other plant, especially fruit species.

## 10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Rasprostranjenost roda <i>Vaccinium</i> u Hrvatskoj .....	4
Tablica 2. Sastav WPM hranjivog medija .....	20
Tablica 3. Tretmani u istraživanju .....	21
Tablica 4. Dimenzije puči i otvora porusa na listovima borovnice po tretmanima i REPETICIJAMA ( $\mu\text{m}$ ).....	23
Tablica 5. Broj puči po tretmanima i repetacijama na listovima borovnice (po $\text{mm}^2$ ).....	24
Tablica 6. Statističke razlike u dimenzijama puči i otvoru porusa po tretmanima u pokusu .....	26



## 11. POPIS SLIKA

Slika 1. Borovnica – <i>Vaccinium corymbosum</i> L.....	3
Slika 2. Američka borovnica proizvodnja u svijetu 2020. i 2021. godine.....	4
Slika 3. <i>V. corymbosum</i> - Američka visokogrmolika borovnica.....	5
Slika 4. Nutritivne karakteristike borovnice.....	7
Slika 5. Mikropropagacija - <i>in vitro</i> izdanci borovnice.....	7
Slika 6. Prikaz razmnožavanja, razvoja kalusa i uvođenja borovnice u kulturu tkiva .....	8
Slika 7. Mikropropagacija borovnice u SETIS™ bioreктору .....	10
Slika 8. Pozitivan utjecaj nano čestica silicija na biljku i tlo .....	11
Slika 9. Aplikacija nano-silicija i utjecaj na klijavost sjemena rajčice.....	12
Slika 10. Fenotipovi i raspodjela puči. ....	14
Slika 11. Fotografija uzoraka distribucije puči u <i>C. camphora</i> .....	15
Slika 12. SETIS™ biorektorska jedinica .....	17
Slika 13. Biljni <i>in vitro</i> materijal borovnice na FAZOS-u.....	18
Slika 14. Niz biorektorskih jedinica SETIS™ s biljnim materijalom .....	19
Slika 15. Prikaz multipliciranih nodijalnih segmenata na WPM mediju – 0 dan, b.) nodijalni segmenti nakon 30 dana kulture.....	19
Slika 16. Shematski prikaz mjerenih parametara dimenzija puči.....	21
Slika 17. Promatranje fragmenata epiderme pod svjetlosnim mikroskopom i fotografiranje .....	22
Slika 18. Biomasa nakon 45 dana kulture.....	23
Slika 19. Originalni izgled uzorka za parametar broj puči po mm <sup>2</sup> donje epiderme lista...25	
Slika 20. Izgled <i>in vitro</i> biljaka borovnice unutar biorektorske posude na kontrolnom tretmanu (K) i tretmanu (Si I) s nančesticama SiO <sub>2</sub> .....	29

## 12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Grafički prikaz razlika između tretmana u a. dimenzije puči i b. broju puči u pokusu.....27

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

## UTJECAJ NANOČESTICA SILICIJA NA ANATOMSKE ZNAČAJKE LISTA BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.) U TEKUĆEM IMERZNOM SUSTAVU BIOREAKTORA

Zita Bece

**Sažetak:** Istraživački dio ovog diplomskog rada proveden je u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS). Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje utjecaja nanočestica silicijevog dioksida ( $\text{SiO}_2$ ) na anatomske značajke lista (veličina, broj i izgled puči) borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) u SETIS™ tekućem imerznom sustavu bioreaktora. Iako statistički razlike nisu bile značajne, puči na tretmanima s nanočesticama, a posebice na tretmanu s nižom koncentracijom nanočestica  $\text{SiO}_2$  od 30 mg/L rezultirale su većim dimenzijama i otvorom porusa u odnosu na kontrolni tretman. Rezultati sugeriraju na mogućnost utjecaja prvenstveno niže koncentracije nanočestica  $\text{SiO}_2$  od 30 mg/L, ali i veće od 75 mg/L na anatomske značajke puči (dimenzije puči i otvora porusa) listova borovnice u imerznom sustavu bioreaktora. Nanočestice  $\text{SiO}_2$  u obje koncentracije (30 i 75 mg/L) su pozitivno utjecale na anatomske karakteristike puči jer su *in vitro* izdanci na oba tretmana razvili veće i krupnije puči u odnosu na kontrolni tretman bez nanočestica. Biljni materijal na kraju ciklusa (45 dana) razvio je idealnu biomasu te nije pokazao znakove stresa, jake vitifikacije ili negativnog utjecaja primijenjenih koncentracija nanočestica  $\text{SiO}_2$ . Vizualnom analizom utvrđena je i veća visina te broj izdanaka na tretmanima s nanočesticama koji su razvili više zelenijih listova u odnosu na kontrolni tretman. Utjecaj primijenjenih koncentracija nanočestica  $\text{SiO}_2$  na razvoj većeg broja puči po  $\text{mm}^2$  epiderme listova eksplantata borovnice u tekućem imerznom sustavu nije potvrđen. Dobiveni rezultati našeg istraživanja naglašavaju potencijal i vrijednost primjene nanočestica  $\text{SiO}_2$  u biljnoj biotehnologiji, posebice na poboljšanje učinkovitosti ishoda *in vitro* metoda razmnožavanja u tekućem imerznom sustavu bioreaktora. Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti ispitivanju drugih koncentracija nanočestica te samih mehanizama na kojima se temelje izneseni učinci ali i optimizaciji njihove primjene na različitim drugim biljnim, odnosno voćnim vrstama.

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

**Mentor:** dr.sc. Dejan Bošnjak

**Broj stranica:** 44

**Broj grafikona i slika:** 21

**Broj tablica:** 6

**Broj literaturnih navoda:** 79

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** borovnica, mikropropagacija, TIB/TIS sustav bioreaktora, nano  $\text{SiO}_2$ , puči

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, predsjednik
2. dr.sc. Dejan Bošnjak, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Monika Marković, član

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek**  
**University graduate study, course Pomology**

**Graduate work**

### **INFLUENCE OF SILICON NANOPARTICLES ON ANATOMICAL CHARACTERISTICS OF BLUEBERRY LEAVES (*Vaccinium corymbosum* L.) IN LIQUID IMMERSION BIOREACTOR SYSTEM**

Zita Bece

**Abstract:** The research component of this thesis was conducted in the Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Pomology, Viticulture, and Enology (Pomology Laboratory) at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek (FAZOS). The aim of this thesis was to examine the effects of silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>) nanoparticles on the anatomical characteristics of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) leaves, specifically the size and number of stomata, within the SETIS™ liquid immersion bioreactor system. Although the statistical differences were not significant, stomata in treatments with nanoparticles, especially with the lower concentration of SiO<sub>2</sub> nanoparticles (30 mg/L), exhibited larger dimensions and pore openings compared to the control treatment. The results suggest a potential effect, primarily of the lower concentration (30 mg/L), but also of the higher concentration (75 mg/L), of SiO<sub>2</sub> nanoparticles on the anatomical features of stomata (size and pore openings) in blueberry leaves grown in the immersion bioreactor system. SiO<sub>2</sub> nanoparticles, at both concentrations (30 and 75 mg/L), positively influenced the anatomical characteristics of stomata, as *in vitro* shoots in both treatments developed larger and more robust stomata compared to the control treatment without nanoparticles. By the end of the 45-day cycle, the plant material had developed an ideal biomass and showed no signs of stress, severe vitrification, or any negative effects from the applied concentrations of SiO<sub>2</sub> nanoparticles. Visual analysis also revealed greater shoot height and an increased number of shoots in nanoparticle-treated plants, which developed more and greener leaves compared to the control treatment. The effect of the applied SiO<sub>2</sub> nanoparticle concentrations on the development of a greater number of stomata per mm<sup>2</sup> of epidermal tissue in blueberry explants in the liquid immersion system was not confirmed. The results of our research emphasize the potential and value of applying SiO<sub>2</sub> nanoparticles in plant biotechnology, particularly in improving the efficiency of *in vitro* propagation methods within the liquid immersion bioreactor system. Future research should focus on testing other nanoparticle concentrations and exploring the mechanisms underlying the observed effects, as well as optimizing their application to other plant, especially fruit species.

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

**Mentor:** dr.sc. Dejan Bošnjak

**Number of pages:** 44

**Number of figures and pictures:** 21

**Number of tables:** 6

**Number of references:** 79

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** blueberry, micropropagation, TIB/TIS system, nano SiO<sub>2</sub>, stomata

**Reviewers:**

1. Aleksandar Stanisavljević, Ph.D., full.prof, president
2. Dejan Bošnjak, Ph.D., mentor
3. Monika Marković, Ph.D., asst.prof., member

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