# Mikropropagacija kupine sorte "Reuben"

**Zec, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:867678

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

# MIKROPROPAGACIJA KUPINE SORTE “REUBEN”

DIPLOMSKI RAD

Martina Zec

Zagreb, rujan, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Biljne znanosti

# MIKROPROPAGACIJA KUPINE SORTE “REUBEN”

DIPLOMSKI RAD

Martina Zec

Mentorica: Prof. dr. sc. Snježana Kereša

Neposredna voditeljica: doc. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović

Zagreb, rujan, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA**

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Martina Zec**, JMBAG 472/2014, rođena dana 10.11.19. u Monfalcone-u, izjavljujem

da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**MIKROPROPAGACIJA KUPINE SORTE "REUBEN"**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

*Potpis studentice*

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE**

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Martine Zec**, JMBAG 472/2014, naslova

**MIKROPROPAGACIJA KUPINE SORTE "REUBEN"**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. Prof. dr. sc. Snježana Kereša mentor _____

   doc. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović neposredni voditelj

   _____

2. Prof. dr. sc. Marija Pecina član _____

3. Doc. dr. sc. Dubravka Dujmović Purgar član _____

# Sažetak

Diplomskog rada studentice **Martine Zec**, naslova

**MIKROPROPAGACIJA KUPINE SORTE "REUBEN"**

Cilj ovog istraživanja bio je utvrđivanje protokola za uspješnu mikropropagaciju kupine sorte "Reuben". Vegetacijski vršci izolirani su aseptično pod stereomikroskopom iz aksilarnih pupova i postavljeni na medij za uspostavljanje kulture (EM). Ispitivan je utjecaj različitih šećera u PM2 mediju u dvije varijante 30 g/L saharoze i 20 g/L glukoze + 10 g/L saharoze.
Kako bi se utvrdila optimalna koncentracija regultora rasta za mikropropagaciju, istraživane su 4 varijante: 6-benzilaminopurin (BAP) u koncentracijama 0,3 mg/L i 1 mg/L te *meta*-Topolin (*m*T) (u jednakim koncentracijama). Zakorjenjivanje *in vitro* provedeno je u dvije varijante, na IAA mediju za zakorjenjivanje i na mediju bez hormona. Najveći broj izdanaka po eksplantatu (2,6) dobiven je na mediju s koncentracijom 1 mg/L BAP-a, a najveća duljina najdužeg izdanka (8,9 mm) na mediju s koncentracijom 0,3 BAP-a. Postotak zakorjenjivanja je bio veći (61%) na mediju za zakorjenjivanje bez hormona, ali postotak aklimatizacije je bio sličan u obadvije varijante (92% i 95%).

**Ključne riječi**: kupina, sorta Reuben, mikropropagacija, 6-bezilaminopurin, *meta*-Topolin

# Summary

Of the master's thesis – student **Martina Zec,** entitled

**MICROPROPAGATION OF BLACKBERRY CULTIVAR "REUBEN"**

The aim of the present study was to establish the protocol for micropropagation of blackberry cultivar "Reuben". In aseptic conditions using stereomicroscope, shoot tips were isolated from axillary buds and placed on medium (EM) to establish aseptic culture. The effect of different sugars on PM2 medium in the two variants of 30 g / L sucrose and 20 g / L glucose + 10 g / L sucrose was tested. In order to establish optimal variant of growth regulators 4 variants were experimented, 6- benzylaminopurine (BAP) in concentration of 0.3 mg/L and 1 mg/L and *meta*-Topolin (*m*T) in same concentrations. *In vitro* rooting was carried out in two experimental variants, on IAA rooting medium and on hormone free rooting medium. The greatest number of shoots with average of 2.6 were produced in medium containing 1 mg/L BAP and the maximum shoot length of 8.9 was produced in medium containing 0.3 mg/L BAP. The rooting percentage was higher (61%) on hormone free rooting medium but the acclimatization percentages for both variants were very similar (92% and 95%).



**Keywords**: blackberry, cultivar Reuben, micropropagation, 6-benzylaminopurine, *meta*-Topolin

Sadržaj

1. Uvod ..... 1

1.1. Cilj istraživanja ..... 1

2. Pregled literature ..... 2

2.1. Kupina ..... 2

2.1.1. Ljekovita svojstva kupine i nutritivne vrijednosti ..... 2
2.1.2. Kupina sorte "Reuben" ..... 4
2.1.3. Razmnožavanje kupine ..... 5

2.2. Mikropropagacija ..... 6

2.2.1. Prednosti i nedostaci mikropropagacije ..... 6
2.2.2. Metode mikropropagacije ..... 7
2.2.3. Potrebna oprema ..... 7
2.2.4. Hranidbeni medij ..... 8

2.3. Učinak različitih šećera i regulatora rasta na mikropropagaciju ..... 10

2.3.1. Mikropropagacija kupine ..... 10

3. Materijali i metode ..... 12

3.1. Sterilizacija biljnog materijala ..... 12

3.2. Sterilizacija pribora ..... 12

3.3. Priprema i sastav hranidbenog medija za uspostavljanje kulture i mikropropagaciju ..... 12

3.4. Uspostavljanje *in vitro* kulture i mikropropagacija ..... 13

3.5. Zakorjenjivanje mikropropagiranih izdanaka ..... 14

3.6. Sadnja u supstrat i aklimatizacija ..... 14

3.7. Statistička analiza podataka ..... 15

4. Rezultati i rasprava ..... 16

4.1. Uspostavljanje kulture biljnog tkiva ..... 16

4.2. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o sastavu šećera ..... 16

4.3. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o različitim citokininima i njihovim različitim koncentracijama ..... 17

4.4. Zakorjenjivanje i aklimatizacija mikropropagiranih izdanaka ..... 22

5. Zaključak ..... 25

6. Popis literature ..... 26

7. Prilog ..... 28

7.1. Popis slika, tablica i grafova ..... 28

7.2. Popis kratica ..... 29

Životopis ..... 30

# 1. Uvod

Kupina (*Rubus fructicosus* L.) postaje sve traženija voćna vrsta zbog izuzetnih nutritivnih vrijednosti. Kupine su bogat izvor antocijana i fenolnih antioksidansa (Siriwoharn i sur., 2004 navedeno u Jafari Najaf-Abadi i Hamidoghli, 2009) što može povoljno utjecati na liječenje i prevenciju raka te kardiovaskularnih oboljenja (Jennings i sur., 1990 navedeno u Jafari Najaf-Abadi i Hamidoghli, 2009). Procjenjuje se da se širom svijeta godišnje proizvede oko 154 578 tona kupine (Strik, 2007 navedeno u Kaume i sur., 2011).

Komercijalno se kupine mogu razmnožavati reznicama, povaljenicama, dijeljenjem busena, a u većim rasadnicima najčešće mikropropagacijom. Zabilježen je veliki broj kultivara kupine razmnožavanih *in vitro* (Wainwright i Flegmann, 1986; Meng i sur., 2004 navedeno u Jafari Najaf-Abadi i Hamidoghli, 2009).

Mikropropagacija može u kratkom vremenu i neovisno o godišnjem dobu osigurati veliki broj zdravih i ujednačenih sadnica ako je optimiziran protokol za pojedini genotip, ali potrebno je puno istraživačkog rada da bi se optimizirali uvjeti za svaku fazu rasta i razvoja (Jafari Najaf-Abadi i Hamidoghli, 2009). Također, predstavlja idealan način razmnožavanja kultura za eksperimentalne svrhe.

"Reuben" je nova sorta kupine izuzetno velikih i slatkih plodova, a rod donosi i na jednogodišnjim izdancima što nije zabilježeno kod drugih komercijalnih sorti kupine. Svojstvo donošenja roda na jednogodišnjim izdancima sa sobom donosi puno prednosti. Za njezino komercijalno širenje izuzetno je važno utvrditi protokol za uspješnu mikropropagaciju.

Kao jedan od najvećih problema mikropropagacije bobičastog voća navodi se pravilna prilagodba koncentracija regulatora rasta te izbor odgovarajuće podloge (Jain i Ishii, 2003).

## 1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada bio je:

(1) utvrditi utjecaj različitog sastava šećera u podlozi na mikropropagaciju kupine sorte "Reuben";

(2) istražiti uspješnost mikropropagacije na MS hranidbenom mediju s različitim citokininima i njihovim različitim koncentracijama;

(3) procijeniti uspješnost *in vitro* zakorjenjivanja kupine i naknadne aklimatizacije

# 2. Pregled literature

## 2.1. Morfologija kupine

Kupina je višegodišnja biljka iz porodice Rosaceae. Pripada redu *Rubus* kao i malina. Kupina je raširena kao divlja na rubovima šuma, u živicama ili zapuštenim površinama. Uzgaja se i kao utilitarna ili ornamentalna biljka u vrtovima i na plantažama.

Stabljika je uspravnog rasta ili povinuta povijuša koja je obično bodljikava ili dlakava. Listovi su jednostavni, obično izmjenično trolisni, perasto sastavljeni s palistićima. Cvjetovi dvospolni, grupirani u grozdaste ili metličaste cvatove. Cvijet je sastavljen od pet bijelih ili ružičastih latica, isto toliko lapova i većeg broja prašnika ili plodnica, koji se nalaze na zajedničkom cvjetištu. Plod je mnogokoštunica srasla sa cvjetnom ložom (Volčević, 2008).

### 2.1.1. Ljekovita svojstva kupine i nutritivne vrijednosti

Kod kupine, za ljekovite svrhe, najčešće se koriste listovi i plod. List sadrži tanine, eterično ulje, pektin, jantarnu, jabučnu, oksalnu, mliječnu i salicilnu kiselinu, nešto vitamina C i inozita. Plod sadrži mnogo vitamina C i A, željeza, kalcija i natrija. Koriste se kod želučanih tegoba, nadutosti, katara želuca, te nadražene sluznice želuca i crijeva, čira na želucu i dvanaesniku. Povoljno utječe na razna krvarenja te jača cijeli organizam (Lesinger, 2006).

Sadrži antioksidanse u obliku antocijana, tanina, elagitanina, galinske kiseline i kvercetina. Antocijani se nalaze u obliku derivata cijanidina (Tablica 2.1.1.1.) koji pridonose njenom visokom antioksidantom djelovanju. U usporedbi s ostalim voćem kupina ima visoku vrijednost ORAC-a (engl. Oxygen radical absorbance capacity - kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala) (Cho i sur., 2004 navedeno u Kaume i sur., 2011). Osim što su jaki antioksidansi, navodi se da antocijani imaju antiupalna, antivirusna, antiproliferativna i antikancerogena svojstva (Skrede i Wrolstad, 2002 navedeno u Kaume i sur., 2011).

Tablica 2.1.1.1. Nutritivne vrijednosti kupine

| **Nutrijent** | **Mjerna jedinica** | **Količina na 100 g** |
|---|---|---|
| Voda | G | 88.15 |
| Energetska vrijednost | kcal | 43 |
| Bjelančevine | G | 1.39 |
| Masti | g | 0.49 |
| Ugljikohidrati | g | 9.61 |
| Dijetna vlakna | g | 5.3 |
| Šećeri | g | 4.88 |
| **Minerali** | | |
| Kalcij | mg | 29 |
| Željezo | mg | 0.62 |
| Magnezij | mg | 20 |
| Fosfor | mg | 22 |
| Kalij | mg | 162 |
| Natrij | mg | 1 |
| Cink | mg | 0.53 |
| **Vitamini** | | |
| Vitamin C | mg | 21 |
| Tiamin | mg | 0.02 |
| Riboflavin | mg | 0.026 |
| Niacin | mg | 0.646 |
| Vitamin B-6 | mg | 0.03 |
| Folna kiselina, DFE | µg | 25 |
| Vitamin B-12 | µg | 0 |
| Vitamin A | µg | 11 |
| Vitamin A | IU | 214 |
| Vitamin E | mg | 1.17 |
| Vitamin D | µg | 0 |
| Vitamin D | IU | 0 |
| Vitamin K | µg | 19.8 |
| **Lipidi** | | |
| Zasićene masne kiseline | g | 0.014 |
| Jednostruko zasićene masne kiseline | g | 0.047 |
| Nezasićene masne kiseline | g | 0.28 |
| **Antocijani** | | |
| Cijanidin | mg | 99.95 |

Izvor: USDA National Nutrient Database for Standard Reference 28 (May 2016)
https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2161

### 2.1.2. Kupina sorte “Reuben”

Za pokus je korištena sorta kupine “Reuben” (Slika 2.1.2.1.). Njena specifičnost je da daje rod i na jednogodišnjim izbojima što rezultira ranijem stupanju u rod i povećanim prinosom. Višerodne (eng. *primocane*) sorte omogućuje ranije stupanje biljke u rod, dva uroda u godini (iako je urod na početku ljeta slabiji). Odlikuje se velikim plodovima (14,5 g) visokom kvalitetom i rodnošću. “Rueben” je sorta povećanog vigora, uspravnog i kompaktnog rasta. Može se razmnožavati dijeljenjem korijena i mikropropagacijom, u tim slučajevima vegetativnog razmnožavanja genetski je stabilna i zadržava sortna obilježja (Google patenti USPP23497, 2013).

Otkrivena je 2005. godine u Fayetteville-u (Arkansas). Nastala je križanjem nekomercijalnih sorti “A-2292T” i “APF-FF”. Oplemenjivači su John Reuben Clark i Jane Fairlie (Google patenti USPP23497, 2013).

“Reuben” se od ženskog roditelja “A-2292T” razlikuje po tome što daje rod na jednogodišnjim izbojima, po bodljikavoj stabljici te po veličini ploda koji u prosjeku teži 14,5 g dok plod “A-2292T” ima prosječnu masu ploda 6 g (Google patenti USPP23497, 2013).
Muški roditelj “APF-FF” također ima manji plod, prosječne mase 8 g. “Reuben” je većeg vigora i više stabljike (Google patenti USPP23497, 2013).

“Reuben” je uspoređen i s jednom komercijalnom sortom “Natchez” koja ima prosječnu masu ploda od 8,9 g do 9,4 g te nema bodljikavu stabljiku (Google patenti USPP23497, 2013).

Svojstvo ovog kultivara da daje rod na jednogodišnjim izbojima donosi mnoge prednosti. Glavna prednost je mogućnost dva uroda u godini. Slabiji urod na početku ljeta, te jači urod u jesen. Drugi urod je značajno kasniji nego kod drugih sorti kupina pa se tako sezona produžuje do 6 tjedana. Za smanjivanje troškova rezidbe neki proizvođači se odlučuju na košnju izboja čime se žrtvuje ljetni urod, ali rezultira većim i kvalitetnijim jesenskim urodom. U tom slučaju se izbjegavaju i posljedice oštećenja uzrokovanih niskim temperaturama zimi što nadalje omogućuje uzgoj kupina na širem geografskom području. Prednost je i prekid životnog ciklusa nekih insekata i patogena (*Cercosporella rubi*) (Pritts, 2008; Clark, 2008).

Slika 2.1.2.1. Kupina sorte “Reuben”

Izvor: Hargreaves plants

### 2.1.3. Razmnožavanje kupine

Komercijalno se kupine razmnožavaju klasičnim vegetativnim metodama. Mogu se razmnožavati reznicama, položenicama te dijeljenjem busena ili korijena. U velikim rasadnicima kupine se razmnožavaju *in vitro*. Mikropropagacija ima prednost pred drugim metodama jer je ekonomski isplativija te omogućuje proizvodnju kroz cijelu godinu. Također isključuje probleme koji se pojavljuju kod ostalih načina razmnožavanja kao što su potreba za velikom površinom i suzbijanje korova kod položenica te probleme zakorjenjivanja reznica (Busby i Himerlick, 1999 navedeno u Jafari Najaf-Abadi i Hamidoghli, 2009).

## 2.2. Mikropropagacija

Mikropropagiranje je postalo pouzdani i rutinski način brzog multipliciranja biljaka koji se temelji na kulturi stanica biljaka, tkiva i organa na prilagođenom hranjivom mediju u sterilnom okruženju i kontroliranim uvjetima. Za *in vitro* proizvodnju biljaka važna je kvaliteta biljnog materijala i ekonomska isplativost (Anonymus 1, 2008). Fokus mikrorazmnožavanja je na uzgoju sadnica biljnog materijala, ali pronalazi svoju svrhu i u raznim istraživanjima, krioprezervaciji ugroženih vrsta, pošumljavanju itd. (Anonymus 2, 2014).

Mikropropagacija se odvija u više faza. Nulta faza obuhvaća postupke prije početka same kulture, zatim slijedi uvođenje u kulturu, umnožavanje i reprodukcija. Prije završne faze gdje se biljčice prenose u zemlju obavlja se priprema kultura za prijenos (Jelaska, 1994).

### 2.2.1. Prednosti i nedostaci mikropropagacije

Prednosti mikropropagacije nad klasičnim vegetativnim razmnožavanjem

- Razmnožavanje *in vitro* mnogo je brže od razmnožavanja *in vivo*
- Moguće je razmnožavati i one biljke koje u uvjetima *in vitro* nije moguće
- biljke često rastu bolje i snažnije od biljaka kloniranih *in vivo*
- U kulturi tkiva razmnožavaju se samo zdrave biljke, postavljanje kulture može početi s odabranim i posebnim materijalom
- Prostor potreban za podizanje i razmnožavanje matičnih biljaka znatno se smanjuje upotrebom kulture *in vitro*
- Zahvaljujući optimalnim uvjetima omogućeno je precizno vremensko planiranje proizvodnje presadnica, čime se postiže proizvodnja kroz čitavu godinu
- Razmnožavanje *in vitro* omogućava zakorjenjivanje reznica pa je cijepljenje pupova na podlogu nepotrebno
- Nove sorte mogu se komercijalno brzo razmnožiti
- Omogućeno je brzo postavljanje roditeljskih klonova za stvaranje $F_1$-hibrida
- Kultura *in vitro* posebno je korisna za osnivanje banke gena

Nedostaci mikropropagacije

- Genetička stabilnost u nekim sustavima razmnožavanja *in vitro* je vrlo niska
- Nakon prijenosa u uvjete *in vivo* propagirane biljke mogu pokazati neke loše značajke
- Kod određenih biljaka zakorjenjivanje i prijenos u uvjete *in vivo* može biti zahtjevno
- Mikropropagirani genotip biljaka može biti osjetljiv na bolest ili uništen od patogenog organizma
- Regenerativna sposobnost može se izgubiti nakon određenog broja supkultura kalusnog tkiva ili stanica
- U nekim slučajevima sterilna izolacija eksplantata je vrlo teška (Jelaska, 1994)

### 2.2.2. Metode mikropropagacije

Nekoliko je metoda mikropropagacije: metoda pojedinačnih nodijskih segmenata, metoda aksilarnog pupanja (grananja), adventivnim izdancima i somatskom embriogenezom.

Metodom aksilarnog pupanja vegetacijski se vršak izolira i na podlozi s relativno visokom koncentracijom citokinina inducira se rast aksilarnih pupova u pazušcima listova. Kada se izdanci razviju, mogu se presaditi na svježu podlogu i postupak se ponavlja dok se ne postigne traženi broj izdanaka koji se onda zakorjenjuju i prenose u zemlju (Jelaska, 1994).

Prednosti metode aksilarnog grananja nad drugim su: metoda je općenito jednostavnija od drugih, stopa umnožavanja je visoka, genetska stabilnost uglavnom je očuvana te je rast tako dobivenih biljaka vrlo dobar (Jelaska, 1994).

### 2.2.3. Potrebna oprema

Upotreba tehnika kulture tkiva zahtjeva određenu opremu. Osim osnovne prijeko potrebne opreme laboratorij bi trebao sadržavati opremu za pripremu hranidbene podloge, opremu za sterilno rukovanje biljnim materijalom te klima-komoru.

Za pripremu hranidbene podloge osim precizne vage za mjerenje tvari u gramima i miligramima, pH-metra, deionizatora, odgovarajućeg laboratorijskog posuđa te različitih kemikalija potreban nam je i uređaj za sterilizaciju hranidbene podloge. Sterilizacija se može izvršiti na više načina: autoklaviranjem, sterilizacijom zračenjem i hladnom sterilizacijom membranskim filtrima. Hranidbeni mediji se najčešće steriliziraju u autoklavu. Autoklav je uređaj za sterilizaciju vrućom parom i povišenim tlakom. Uspješna će sterilizacija ovisiti o trajanju, tlaku, temperaturi te o volumenu tvari koja se sterilizira.

U opremu za sterilno rukovanje biljnim materijalom spada kabinet s protokom sterilnog zraka, plamenik, filter papir, ploče za sterilno rezanje, petrijeve zdjelice, 96%-tni alkohol, parafilm, aluminijska folija i dr. Kabinet s protokom sterilnog zraka ("laminar air-flow cabinet") još se naziva i laminar. Laminar osigurava sterilan prostor pri svim postupcima s biljnim materijalom. Izrađen je tako da se zrak usisava s jedne strane i propuhuje kroz posebne filtre koji ne propuštaju sitne čestice veličine mikroorganizama, a nakon toga čist i sterilan zrak ispuhuje se u radni dio komore u kojoj se obavlja rad.

Klima-komora je prostor za uzgoj kultura. Za mikropropagiranje u komori je potreban nadzor nad temperaturom, izvor električne energije, police za kulture, fluorescentne cijevi za osvjetljenje, preklopni sat za reguliranje duljine dana i sl. (Jelaska, 1994).

### 2.2.4. Hranidbeni medij

Uspješnost kulture stanica, tkiva ili organa ovisit će o izboru pogodnog sastava hranidbene podloge. Bez obzira na različitosti između hranidbenih medija koje se danas upotrebljavaju, sve one sadrže mineralne soli, ugljikohidrate kao izvor energije, vitamine i regulatore rasta. Medij Murashige i Skoog (1962) (Tablica 2.2.4.1.), poznat po skraćenici MS, najviše je upotrebljavana podloga koja se uspješno primjenjuje za velik broj kultura. Kad se u literaturi navodi podloga MS to podrazumijeva da je sastav mineralnih soli istovjetan podlozi MS, a drugi dodaci mogu odstupati i razlikovati se od originalnog sastava (Jelaska, 1994).

Tablica 2.2.4.1. Kombinacija mineralnih soli u Murashige i Skoog (1962) hranidbenoj podlozi

| **Sol** | **Količina (mg/l)** |
|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 1650 |
| $H_3BO_3$ | 6,2 |
| $CaCl_2x2H_2O$ | 440 |
| $CoClx6H_2O$ | 0,025 |
| $CuSO_4x5H_2O$ | 0,025 |
| $FeSO_4x7H_2O$ | 27,8 |
| $MgSO_4x7H_2O$ | 370 |
| $MnSO_4x7H_2O$ | 22,3 |
| KI | 0,83 |
| $KNO_3$ | 1900 |
| $KH_2PO_4$ | 170 |
| $Na_2xEDTA$ | 37,3 |
| $Na_2MoO_4x2H_2O$ | 0,25 |
| $ZnSO_4x7H_2O$ | 8,6 |

Izvor: Murashige i Skoog, 1962

#### 2.2.4.1. Regulatori rasta

Rast i razvoj biljaka nadzire skupina malih molekula koji se nazivaju biljni hormoni. Razina ovih molekula u biljaka tipično se mijenja pod utjecajem faktora iz okoliša, kao što su svijetlo ili infekcija, tako da se odgovori tkiva u različitim dijelovima biljke usklađuju sa signalima iz okoline.

Biljni su hormoni klasično podijeljeni u pet velikih skupina: auksini, giberelini, citokinini, apscizinska kiselina i etilen (Cooper i Hausman, 2004).

U mikropropagaciji se najčešće koriste sintetski fitohormoni (auksini i citokinini) za reguliranje rasta i razvoja.

Osim auksina, citokinini su najznačajnija grupa fitohormona. U kulturi tkiva citokinini su neophodni za diobu stanica. Za poticanje razvoja aksilarnih pupova i reduciranje apikalne dominacije izdanaka, jedan ili više citokinina dodaju se u medij u fazi multiplikacije ( George i sur. 2007. navedeno u Jafari Najaf – Abadi i Hamidoghli, 2009) .

Citokinini reguliraju rast biljke, razvoj organa i upravljaju mnogim fiziološkim procesima. Dosad su stekli najveći potencijal u biotehnologiji kao komponente različitih nutritivnih medija u kulturi tkiva. Korištenjem optimalne koncentracije citokinina u hranidbenoj podlozi dobivamo biljke sa željenim karakteristikama. 6-benzilamiopurin (BAP) i kinetin su najčešće korišteni citokinini zbog njihove visoke biološke aktivnosti, dostupnosti i niske cijene (Podlešáková, 2012).

Jedan od najboljih citokinina, BAP, korišten za poticanje rasta aksilarnih pupova pokazao je negativne učinke u periodu aklimatizacije biljaka. Akumulirani derivati BAP-a inhibirali su zakorjenjivanje te inducirali heterogenost u rastu. Stoga su potrebni novi proizvodi za eliminiranje negativnih efekata (Valero-Aracama i sur., 2010 navedeno u Kőszeghi i sur., 2014).

Werbrouck i sur. (1996.) testirali su citokinine dostupne na tržištu slične BAP-u kako bi pronašli alternativu. Takav citokinin trebao bi biti učinkovit, potaknuti rast dovoljnog broja kvalitetnih izdanaka i ne bi smio proizvoditi stabilne derivate kao BAP. Pretpostavka je da je to uzrok inhibicije zakorjenjivanja u periodu aklimatizacije. Zaključak ove studije jest da je *meta*-Topolin (*m*T) odgovarajuća alternativa BAP-u kod mikropropagacije *Spathiphyllum floribindum*. *Meta*-Topolin je aromatski citokinin, izoliran iz topole. Brzo se razgrađuje tijekom aklimatizacije, ne inhibira zakorjenjivanje, te je učinkovit u multiplikaciji.

## 2.3. Učinak različitih šećera i regulatora rasta na mikropropagaciju

Saharoza je najupotrebljivaniji šećer u mikropropagaciji ali, unatoč dobrim rezultatima i ostali šećeri (glukoza, fruktoza, sorbitol) se navode kao prikladni izvori energije za kulturu tkiva različitih vrsta (Romano i sur., 1995). Dokazano je da je glukoza učinkovit izvor ugljikohidrata u kulturi tkiva kod vrsta iz roda *Alnus* (Tremblay i Lalonde, 1984 navedeno u Romano i sur., 1994), te vrsta *Potentilla fruticosa* L. i *Ficus lyrata* (Wainwright i Scrace, 1989 u Romano i sur., 1994).

U istraživanju uloge ugljikohidrata na mikropropagaciju hrasta plutnjaka ispitani su saharoza, fruktoza, glukoza i sorbitol u različitim koncentracijama. Najveći broj izdanaka po eksplantatu bio je na mediju koji sadržava glukozu. Ipak, Romano i sur. (1994) navode kako je saharoza pogodnija jer nema značajne razlike u stopi proliferacije, a dala je dulje izdanke.

Ispitivanjem utjecaja saharoze, glukoze i fruktoze na mikropropagaciju vrste *Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim. došlo se do zaključka da je za ovu vrstu najpogodnija fruktoza (Ilczuk i sur., 2013).

Gentile i sur. (2014) u svom radu su procjenivali učinak *mT* i BAP-a u odnosu na proliferaciju kod podloga šljive "Torinel" i "Ferdor". Rezultati su dokazali da *mT* nije poboljšao proliferaciju izdanaka ni u jednoj od tri ispitanih koncentracija, međutim pokazao je pozitivan utjecaj na rast i kvalitetu izdanaka.

Štefančić i sur. (2005) ispitivanjem hormona IAA i IBA na zakorjenjivanje podloge šljive "Gisela 5" došli su do zaključka da je IBA bila učinkovitija u zakorjenjivanju, spriječila je razvoj kalusa u ranom periodu zakorjenjivanja. Također je utjecala na jači rast i razvoj izdanaka i korijena. Utvrdili su i da hormoni nisu utjecali na uspješnost aklimatizacije biljaka.

### 2.3.1. Mikropropagacija kupine

MS podloga osigurava razvoj biljaka i dobru stopu multiplkacije za sortu "Thornless Evergreen" (Fira i sur., 2009, 2010). U prvom istraživanju za multiplikaciju se koristio medij s dodacima BAP , IBA i $GA_3$ kao regulatorima rasta. Ispitivali su tri različite koncentracije BAP-a 0,3 mg/L, 0,5 mg/L i 0,7 mg/L. Sve varijante su dale dobre rezultate, ali pri najnižoj koncentraciji izdanci su bili većeg vigora, dulji te su zakorjenili *in vitro*.

U drugom istraživanju (Fira i sur., 2010) usporedili su utjecaj BAP-a i kinetina na multiplikaciju. Dobiveni su slični rezultati. Regulator rasta BAP u koncentracijama od 0,5-0,7 mg/L osigurava visoku stopu multiplikacije, dok povećanje koncentracije na 1 mg/L smanjuje razinu multiplikacije. Korištenjem kinetina u koncentraciji 4 mg/L i 8 mg/l stopa multiplikacije bila je značajno niža.

U radu Fira (2013) istraživan je optimalni protokol za mikropropagaciju sorte "Loch Ness". Vrlo učinkovitim se pokazao MS medij s 0,5 mg/L BAP koji daje odlične rezultate vezano za rast *in vitro* i proliferaciju. Povećanjem koncentracije na 0,7 mg/L povećava se i stopa multiplikacije, ali uzrokuje deformacije biljaka. Istražen je utjecaj još nekih citokinina.

Ružić i Lazić (2006) provodili su pokus na kultivarima “Čačanska bestrna” i “Čačanska crna” s ciljem pronalaska optimalne koncentracije regulatora rasta. Za fazu multiplikacije korišten je MS medij s dodatkom 0,1 mg/L IBA, 0,1 mg/L $GA_3$ i BAP u koncentraciji od 0,5 mg/L do 1 mg/L. Koncentracija BAP-a od 1 mg/L kod sorte “Čačanska bestrna” rezultirala je visokom stopom multiplikacije. Smanjenje koncentracije na 0,5 mg/L smanjilo je stopu multiplikacije, ali dobiveni su značajno dulji izdanci. Kultivar “Čačanska bestrna” je uspješno mikropropagiran dok je za “Čačansku crnu” potrebno daljnje istraživanje u svrhu optimizacije uvjeta za multiplikaciju.

Clapa (2014) je provodila istraživanje s ciljem uspostavljanja učinkovitog i jeftinog protokola za masovnu mikropropagaciju nekoliko kultivara kupine (“Čačanska bestrna”, “Chester”, “Thornless”, “Loch Ness” i “Navaho” testiranjem i optimiziranjem tehnika koje su već dale dobre rezultate kod mikropropagacije drugih kultivara kupine. Dokazano je da je optimalna koncentracija BAP-a 0,5 mg/L za “Chester Thornless” i “Loch Ness” i 0,3 mg/L za “Navaho”. Za “Čačansku bestrnu” mogu se koristiti obje koncentracije. Kultivari se mogu uspješno propagirati kako bi proizveli biljni materijal koji osigurava visoku stopu proliferacije i ekonomsku isplativost ove metode.

U radu Borowskog i sur. (1996) istražuje se utjecaj BAP-a na kultivare kupine “Ebano”, “Tupi” i “Guarany”. Kod svih kultivara najbolja multiplikacija postignuta je na MS mediju s dodatkom 1 ili 2 mg/L BAP-a, ali sa značajnim razlikama među kultivarima.

Shuch i sur. (1993), kako je navedeno u radu Borowskog i sur. (1996) zaključuju kako kod jabuka potreba za dodatkom BAP-a ovisi o endogenom sadržaju citokinina svakog kultivara. Njihova međusobna interakcija utječe na multiplikaciju, što može objasniti slične rezultate dobivene koristeći BAP u koncentracijama od 1 mg/L i 2 mg/L kod različitih kultivara kupine.

# 3. Materijali i metode

## 3.1. Sterilizacija biljnog materijala

Jednogodišnji izdanci kupine "Reuben" sakupljeni su krajem siječnja na jednom OPG-u kod Križevaca. Izdanci su rezani na duljinu oko 5 cm i podvrgnuti sterilizaciji. Biljni materijal je najprije ispiran tekućom vodom iz slavine 30 minuta. Sterilizacija je obavljena umakanjem izdanaka u 70%-tni alkohol 2 minute i nakon toga u 3%-tnu otopinu Izosana G (Pliva) 15 minuta. Otopini Izosana G dodano je nekoliko kapi detergenta Tween 20 (okvašivač) za smanjenje površinske napetosti. Biljni materijal je potom ispran 3 x 5 minuta u sterilnoj destiliranoj vodi u koju je dodana askorbinska kiselina u koncentraciji 150 mg/L.

## 3.2. Sterilizacija pribora

Pribor, tj. skalpeli i pincete, i stakleno laboratorijsko posuđe sterilizirano je u autoklavu u trajanju od 25 minuta na temperaturi od 121°C i tlaku od 1 bara, nakon čega je sušeno u suhom sterilizatoru. Prilikom korištenja u sterilnom prostoru laminara, pincete i skalpeli su učestalo sterilizirani na plameniku.

## 3.3. Priprema i sastav hranidbenog medija za uspostavljanje kulture i mikropropagaciju

Mediji za uspostavljanje kulture i mikropropagaciju prikazani su u tablicama 3.3.1. i 3.3.2. pH svih medija prilagođen je na 5.8. Nakon dodavanja 8 g/L Bacto agara (Difco), mediji su sterilizirani u autoklavu 25 min na 121°C i pri tlaku od 1 bara, nakon čega su izlijani u staklene epruvete ili Magenta posudice također sterilizirane u autoklavu.

Tablica 3.3.1. Sastav medija za uspostavljanje kulture i prvi pokus aksilarnog grananja u ovisnosti o sadržaju šećera

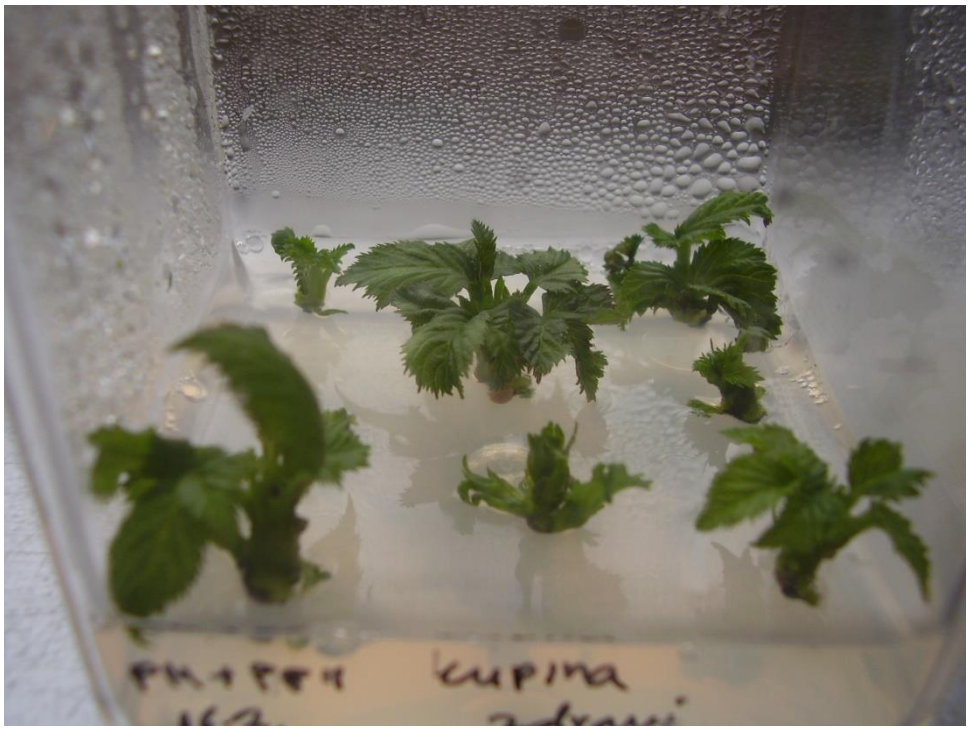
| **Medij** | **Sastav medija** |
|---|---|
| MS HFM | MS makro- i mikroelementi, MS vitamini, 0,1 g/L inozitola, 30 g/L saharoze, Bacto-agar (Duchefa) 8 g/L, pH 5,8 |
| EM | MS HFM + 0,7 mg/L BAP + 0,5 g/L aktivnog ugljena |
| PM 1 | MS HFM, ali sa $FeSO_4xH_2O$ 2x, 1 mg/L BAP, 0,1 mg/L indolil-3-maslačne kiseline (IBA), 0,1 mg/L giberelinske kiseline (GA3) |
| PM 2-SAH | MS HFM, ali sa $FeSO_4xH_2O$ 2x, $KH_2PO_4$ 2x, $KNO_3$ 1/2x, $NH_4NO_3$ 1/2x, 1 mg/L BAP, 0,1 mg/L IBA, 0,5 mg/L GA3 (30 g/L saharoze) |
| PM 2-GLU+SAH | PM 2, ali s 20 g/L glukoze +10 g/L saharoze |

Tablica 3.3.2. Tretmani korišteni u ispitivanju učinkovitosti aksilarnog grananja u ovisnosti o citokininima i njihovim različitim koncentracijama

| **Tretmani** | **Sastav medija** |
|---|---|
| MS PM BAP 1 | = PM 2-SAH |
| MS PM BAP 0,3 | PM 2-SAH + BAP 0,3 mg/L |
| MS PM *m*T 1 | PM 2-SAH + 1 mg/L *m*T |
| MS PM *m*T 0,3 | PM 2-SAH + 0,3 mg/L *m*T |
| MS PM HFM | kao svi MS PM mediji, ali bez hormona |

## 3.4. Uspostavljanje *in vitro* kulture i mikropropagacija

Vegetacijski vršci izolirani su aseptično pod stereomikroskopom iz aksilarnih pupova i postavljeni na medij za uspostavljanje kulture (EM - eng. *Establishment Medium*). Izdanci su jednom bili supkultivirani na PM 1 medij (eng. *Proliferation* Medium) prije proizvodnje dovoljnog broja izdanaka (Slika 3.4.1.) za postavljanje pokusa. Koncentracija željeza u PM mediju udvostručena je u odnosu na EM medij, a promijenjen je i sastav regulatora rasta (Tablica 3.3.1.). Na ovom su mediju izdanci supkultivirani dva puta tj. do proizvodnje dovoljnog broja izdanaka za postavljanje pokusa.




Slika 3.4.1. Izdanci na PM mediju nakon supkultivacije s medija za uspostavljanje kulture (Foto: S. Kereša)

U prvom pokusu u kojem je ispitivana učinkovitost aksilarnog grananja tj. proliferacije izdanaka iz postavljenih eksplantata (vrškovi izdanaka duljine 0,5-1 cm) variran je sadržaj šećera u podlozi pa je korištena ili samo saharoza (medij PM 2-SAH) ili glukoza 20 g/L + saharoza 10 g/L (PM 2-GLU+SAH). Na svaki od ovih medija postavljena su po 63 eksplantata (7 Magenti sa po 9 eksplantata).

U drugom pokusu u kojem je ispitivana učinkovitost aksilarnog grananja tj. proliferacije izdanaka iz postavljenih eksplantata (vrškovi izdanaka duljine 0,5-1 cm) varirana je vrsta i koncentracija regulatora rasta. Izdanci su zato bili postavljeni na PM 2-SAH, ali s različitim vrstama citokinina (BAP ili *m*T) u dvije koncentracije (1 mg/L ili 0,3 mg/L) te na isti takav medij bez hormona – HFM (eng. *Hormone Free Medium*) (Tablica 3.3.2.). Na svaki od ovih tretmana bilo je postavljeno od 54-63 eksplantata (6 ili 7 Magenta posudica sa po 9 eksplantata).

Supkultivacije i mjerenja rađena su razmaku od 30 dana.

U jednom i drugom pokusu inducirana je mikropropagacija aksilarnim grananjem tj. multipliciranjem izdanaka iz postojećih meristema u bazalnim aksilarnim pupovima izdanaka (eksplantata).

## 3.5. Zakorjenjivanje mikropropagiranih izdanaka

Mikropropagirani izdanci duljine 1-1,5 cm postavljeni su na medij za ukorjenjivanje (RM) slijedećeg sastava: MS makro- i mikroelementi, ali sa $FeSO_4xH_2O$ 2x, $KH_2PO_4$ 2x, MS vitamini, 0,1 g/L inozitola, 30 g/L saharoze, Bacto-agar (Duchefa) 8 g/L, pH 5,8. Najveći broj izdanaka (188 kom) postavljen je na ovakav medij bez hormona (HF RM), a manji broj (49) na HF RM+1 mg/L IAA (IAA RM). Faza zakorjenjivanja trajala je 50 dana.

Sve faze rasta *in vitro* odvijale su se u komori rasta pri 22°C, fotoperiodu 16 sati dan/8 sati noć i intenzitetu svjetla od 40 µE $m^{-2}s^{-1}$.

## 3.6. Sadnja u supstrat i aklimatizacija

Prije sadnje s korijenja je opran medij za zakorjenjivanje. Biljke su nakon toga posađene u smjesu komposta (2/3) i perlita (1/3), prekrivene plastičnom prozirnom folijom te aklimatizirane u komori rasta na 20 °C, fotoperiodu 16 sati dan/8 sati noć i intenzitetu svjetla od 40 µE $m^{-2}s^{-1}$.

## 3.7. Statistička analiza podataka

Pokusi su bili postavljeni po potpuno slučajnom rasporedu.

Svojstva opažana (mjerena) u ovim pokusima bila su: broj izdanaka po eksplantatu i duljina izdanaka. Mjereni su svi izdanci na eksplantatu, iz čega su kao varijable izračunate duljina najduljeg izdanka te prosječna duljina svih izdanaka (mm).

Za analizu utjecaja sadržaja šećera u hrandibenoj podlozi (PM 2-SAH i PM 2-GLU+SAH) provedena je jednofaktorska analiza varijance.

Za utjecaj različitih citokinina u podlozi (BAP i mT) i njihovih različitih koncentracija (1 mg/L i 0,3 mg/L) provedena je dvofaktorska analiza varijance (pokus 2 x 2). Provedena je i dodatna jednofaktorska analiza varijance za učinak pet tretmana i to: četiri kombinacije citokininin x koncentracija te isti takav medij bez hormona – MS PM HFM na svojstva mikropropagacije.

Srednje vrijednosti su uspoređene LSD-testom ili Duncan-ovim testom na razini signifikantnosti $P \leq 0,05$ (SAS, 2010).

# 4. Rezultati i rasprava

## 4.1. Uspostavljanje kulture biljnog tkiva

Na medij za uspostavljanje kulture, svaki u zasebnoj epruveti pokrivenoj vatom i aluminijskom folijom, bila su postavljena ukupno 23 aseptično izolirana vegetacijska vrška kupine veličine 0.5 - 1 mm. Devet dana nakon uvođenja u *in vitro* kulturu vegetacijski vršci su supkultivirani na medij za proliferaciju s povećanom koncentracijom regulatora rasta te udvostručenom koncentracijom željeza (PM 1) jer su vrlo rano, tijekom formiranja rozete, primijećeni znakovi kloroze. Slično ovome, kloroza izdanaka kupine se je pojavila u istraživanju Ružić i Lazić (2006) s jednom od dvije mikropropagirane sorte kupine te su također kao mjeru udvostručili koncentraciju željeza u mediju. Na ovom mediju za proliferaciju svi eksplantati su nastavili rasti i aksilarno granati proizvodeći u prosjeku 2,8 izdanaka po eksplantatu. Na PM 1 mediju su izdanci supkultivirani dva puta tj. do proizvodnje dovoljnog broja izdanaka za postavljanje pokusa.

## 4.2. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o sastavu šećera

U prvom pokusu varirana je vrsta šećera u podlozi, ali je i dodatno bio promijenjen sastav makro soli u medijima zbog crvenila i smeđenja rubova listova što je mogao biti znak nedostatka fosfora. Zato je makro sol $KH_2PO_4$ u svim daljnjim fazama *in vitro* kulture korištena u dvostrukoj koncentraciji.

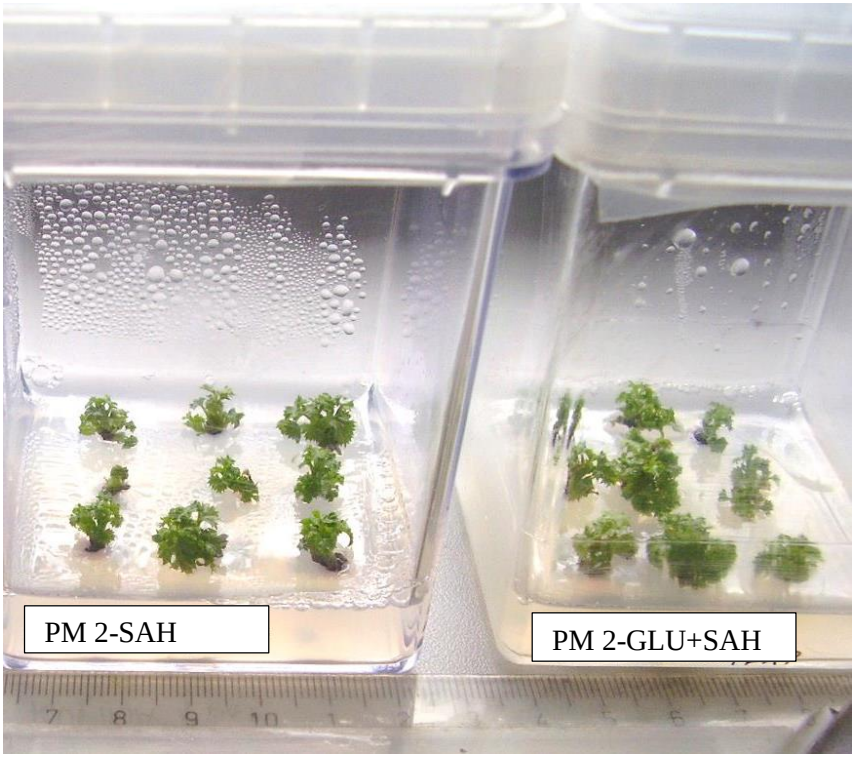
Analiza varijance pokazala je da je različit sastav šećera u mediju signifikantno utjecao na svojstva duljine izdanaka - najdulji izdanak i prosječnu duljinu svih izdanaka, ali nije imao signifikantan učinak na broj izdanaka po eksplantatu. Duljina najduljeg izdanka, kao i prosječne duljine svih izdanaka bile su signifikantno veće na mediju koji je sadržavao glukozu i saharozu (PM 2-GLU+SAH) (Tablica 4.2.1., Slika 4.2.1.).

U istraživanju mikropropagacije hrasta plutnjaka Romano i sur. (1994) dobili su najveći broj izdanaka na mediju koji je sadržavao glukozu, iako je medij s 3% saharoze dao slične rezultate. Ovo je sukladno našim rezultatima. Za razliku od navedenog istraživanja hrasta plutnjaka, gdje je saharoza bila bolja u izduživanju izdanaka, kod kupine je duljina najduljeg izdanka bila veća na mediju s 20 g/L glukoze + 10 g/L saharoze. Rezultati upućuju na to da je kombinacija glukoze i saharoze imala pozitivan učinak na mikropropagaciju i može se preporučiti.

Tablica 4.2.1. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o sadržaju šećera u mediju

| **Sadržaj sećera u mediju** | Broj izdanaka po eksplantatu | Duljina najduljeg izdanka (mm) | Prosječna duljina svih izdanaka (mm) |
|---|---|---|---|
| PM 2-SAH | 2,7 a* | 5,2 b | 4,2 b |
| PM 2-GLU+SAH | 3,0 a | 6,4 a | 5,1 a |

*vrijednosti označene istim slovom unutar kolone ne razlikuju se signifikantno




Slika 4.2.1. Izdanci propagirani na mediju PM 2-SAH i PM 2-GLU+SAH (Foto: S. Kereša)

## 4.3. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o različitim citokininima i njihovim različitim koncentracijama

Provedena dvofaktorska analiza varijance u kojoj je prvi faktor bila vrsta, a drugi koncentracija citokinina pokazala je da vrsta citokinina kao i interakcija vrste i koncentracije citokinina signifikantno utječu na broj izdanaka po eksplantatu. Što se tiče duljine najduljeg izdanka kao i prosječne duljine svih izdanaka, vrsta citokinina nije pokazala signifikantan

učinak, ali jest koncentracija citokinina. Na prosječnu duljinu svih izdanaka signifikantan učinak pokazala je i interakcija vrste i koncentracije citokinina

Broj izdanaka po eksplantatu na mediju s BAP-om (2,2) (prosjek obje koncentracije) bio je značajno veći nego na mediju s *m*T (1,7) ili na mediju bez regulatora rasta (HFM) (0,8). Istraživanje na podlogama šljive (Gentile i sur., 2014) također je pokazalo da je *m*T neučinkovit citokinin na proliferaciju izdanaka. Prosječne duljine izdanaka nisu značajno različite ovisno o vrsti citokinina, ali su značajno manje nego na mediju bez dodanih hormona (Tablica 4.3.1). BAP i *m*T su, možemo reći, inhibirali rast izdanaka u visinu, što zapravo je odlika citokinina. Oni potiču formiranje novih aksilarnih izdanaka, ali ujedno smanjuju njihovu visinu.

Tablica 4.3.1. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o vrsti regulatora rasta (citokinina) u mediju

| **Regulator rasta (citokinin) u mediju** | Broj izdanaka po eksplantatu | Duljina najduljeg izdanka (mm) | Prosječna duljina svih izdanaka (mm) |
|---|---|---|---|
| BAP | 2,2 a | 7,1 b | 6,2 b |
| *m*T | 1,7 b | 7,4 b | 6,6 b |
| HFM | 0,8 c | 8,8 a | 11,0 a |

*vrijednosti označene istim slovom unutar kolone ne razlikuju se signifikantno prema LSD testu

Koncentracije citokinina (BAP-a i *m*T) od 1 mg/L , suprotno očekivanju, nisu znatno povećale broj izdanaka po eksplantatu. Manja koncentracija citokinina nije inhibirala rast izdanaka, zato su duljine izdanaka signifikantno veće na medijima koji su sadržavali citokinine u koncentraciji od 0,3 mg/L. Najveća prosječna duljina svih izdanaka postignuta je na mediju bez regulatora rasta (Tablica 4.3.1.).

Ovi rezultati su slični rezultatima istraživanja koje su proveli Ružić i Lazić (2006), Fira (2010, 2013) gdje se povećanjem koncentracije citokinina značajno povećala proliferacija, a duljina izdanaka je značajno smanjena.

Tablica 4.3.2. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o koncentraciji regulatora rasta (citokinina) u mediju

| **Koncentracija regulatora rasta** | Broj izdanaka po eksplantatu | Duljina najduljeg izdanka (mm) | Prosječna duljina svih izdanaka(mm) |
|---|---|---|---|
| 1 mg/L | 2,1 a | 5,7 b | 4,9 c |
| 0,3 mg/L | 1,8 a | 8,6 a | 7,7 b |
| 0,0 mg/L | 0,8 b | 8,8 a | 11,1 a |

*vrijednosti označene istim slovom unutar kolone ne razlikuju se signifikantno prema LSD testu

Jednofaktorska analiza varijance provedena kako bi se utvrdio učinak tretmana na svojstva mikropropagacije pokazala je da tretmani signifikantno utječu na sva tri svojstva.

Broj izdanaka po eksplantatu bio je najveći i signifikantno različit od ostalih tretmana korištenjem MS PM BAP 1 medija (2,6) (Tablica 4.3.3.). Tretman s koncentracijom BAP-a 0,3 mg/L i mediji s *meta*-Topolinom (obadvije koncentracije), dali su značajno manji broj izdanaka po eksplantatu.

Slične indekse multiplikacije izdanaka (od 1,46-2,45) kod sorte kupine „Čačanska bestrna“ dobili su Ružić i Lazić (2006) koristeći MS medij s dodatkom BAP-a u koncentraciji 0,5 ili 1 mg/L + GA3 0,1 mg/L + IBA ili NAA 0,1 mg/L.

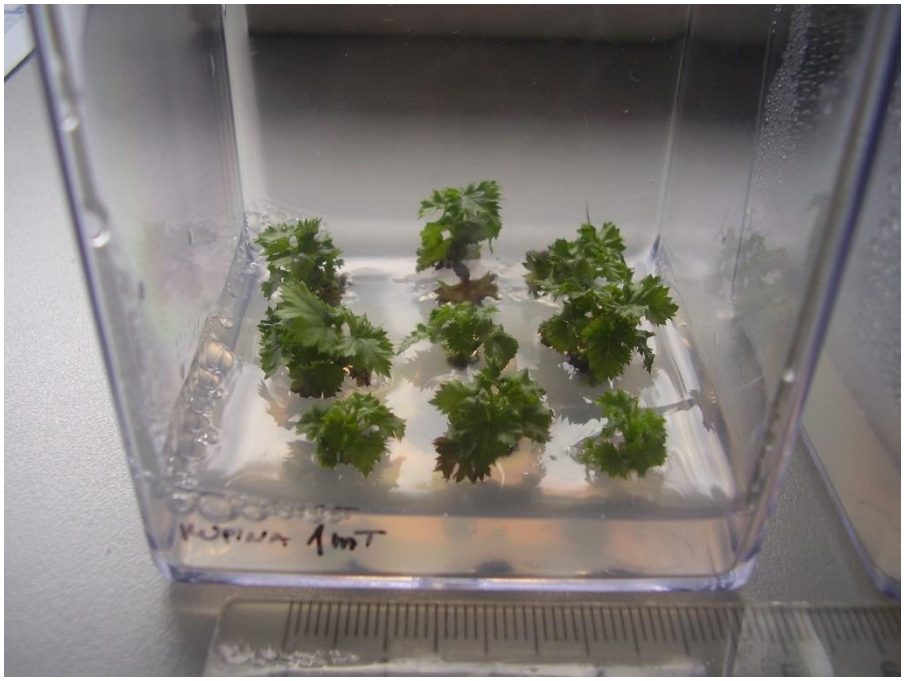
Na MS PM BAP 1 mediju, koji je imao najveći broj izdanaka po eksplantatu duljine izdanaka bile su najmanje (Slika 4.3.1). *Meta*-Topolin u koncentraciji od 1 mg/L se nije pokazao učinkovit, nije povećao broj izdanaka i razvijeni izdanci su značajno kraći nego što su bili na mediju sa manjom koncentracijom citokinina i na mediju bez hormona (Slika 4.3.2.). Tretman MS PM BAP 0,3 pokazao je manji učinak multiplikacije izdanaka po eksplantatu od tretmana MS PM BAP 1, ali je dao izdanke značajno dulje od ostalih tretmana s citokininima (Tablica 4.3.2.). Tretman MS PM *m*T 0,3 ima slične rezultate kao i tratman MS PM BAP 0,3 (Slika 4.3.3. i 4.3.4.).

Tablica 4.3.3. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o kombiniranom učinku vrste i koncentracije regulatora rasta (tretmani)

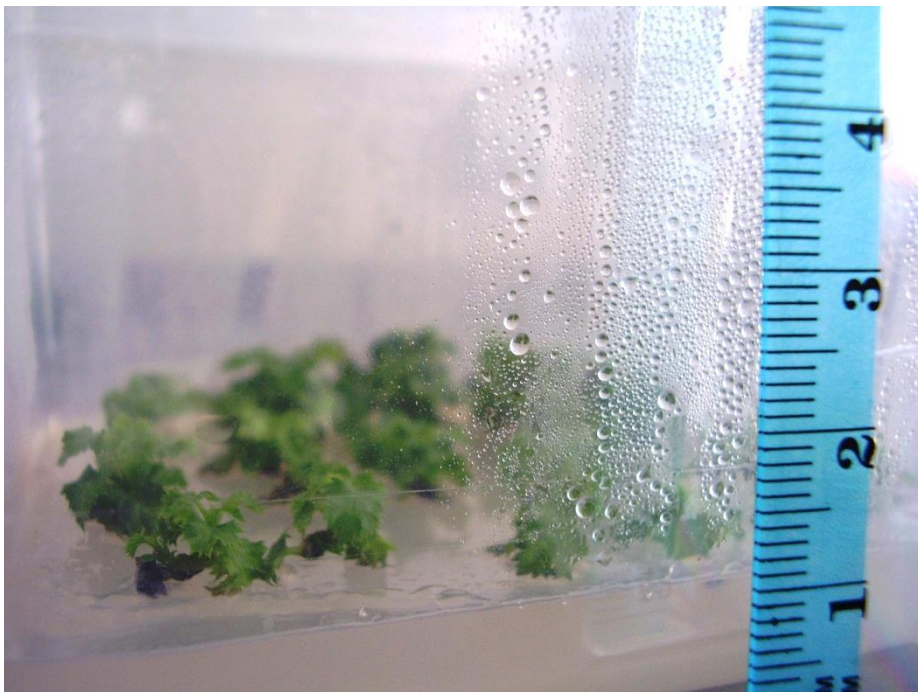
| **Tretmani** | Broj izdanaka po eksplantatu | Duljina najduljeg izdanka (mm) | Prosječna duljina svih izdanaka (mm) |
|---|---|---|---|
| MS PM BAP 1 | 2,6 a | 5,1 b | 4,2 d |
| MS PM BAP 0,3 | 2,0 b | 8,9 a | 8 b |
| MS PM *m*T 1 | 1,6 b | 6,2 b | 5,6 c |
| MS PM *m*T 0,3 | 1,7 b | 8,3 a | 7,4 b |
| MS PM HFM | 0,8 c | 8,8 a | 11 a |

*vrijednosti označene istim slovom unutar kolone ne razlikuju se signifikantno prema Duncan-ovom testu

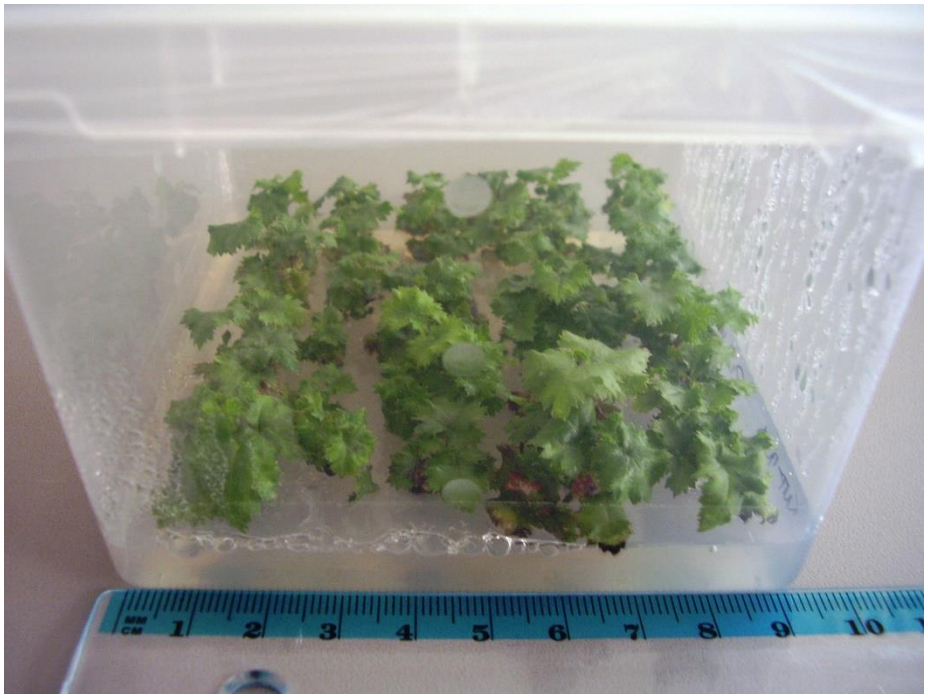
Slika 4.3.1. Izdanci dobiveni aksilarnim grananjem na MS PM BAP 1 (Foto: S. Kereša)



Slika 4.3.2. Izdanci dobiveni aksilarnim grananjem na MS PM *m*T 1 (Foto: S. Kereša)



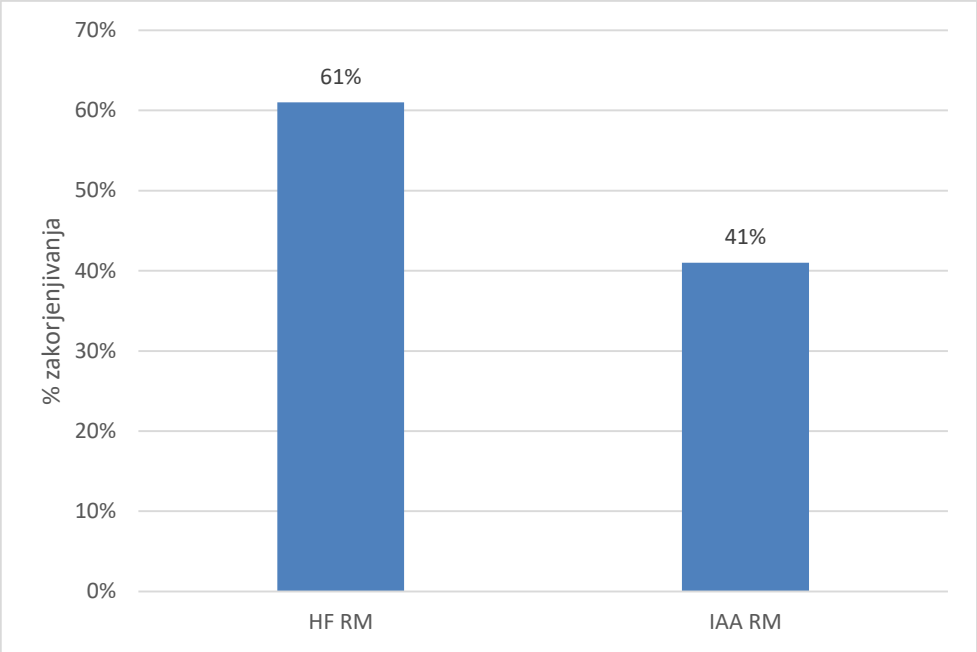
Slika 4.3.3. Izdanci dobiveni aksilarnim grananjem na MS PM BAP 0,3 (Foto: S. Kereša)



Slika 4.3.4. Izdanci dobiveni aksilarnim grananjem na MS PM *m*T 0,3 (Foto: S. Kereša)

## 4.4. Zakorjenjivanje i aklimatizacija mikropropagiranih izdanaka

Uspješnost zakorjenjivanja bila je 61% na mediju bez hormona, a 41% na mediju s dodatkom IAA (Graf 4.4.1.). Korijenje je bilo dugačko i dovoljno razgranato (Slika 4.4.1.). Uspješnost zakorjenjivanja na HF RM usporediva je s postotkom *ex vitro* zakorijenjenih (in vitro propagiranih) izdanaka kupine sorata „Chester Thornless“ i „Čačanska bestrna“ (Fira i sur., 2014). Međutim, ovaj postotak zakorijenjenih izdanaka nije zadovoljavajući te protokol zakorijenjivanja treba još optimizirati.




Graf 4.4.1. Postotak zakorjenjivanja na HF RM i IAA RM

Slika 4.4.1. *In vitro* zakorijenjena biljka na HF RM (Foto: S. Kereša)

Zbog dobro razvijenog korijenja uspješnost aklimatizacije bila je vrlo visoka (Slika 4.4.1.). Aklimatizaciju je preživjelo 92% biljaka zakorijenjenih na HF RM (bez hormona) i 95% biljaka zakorijenjenih na IAA RM (medij s 1 mg/L IAA) (Slika 4.4.2.).

Slika 4.4.2.. Aklimatizirane biljke kupine (Foto: S. Kereša)

# 5. Zaključak

Uspješno je provedena mikropropagacija kupine sorte “Reuben” na modificiranoj MS hranidbenoj podlozi uz dodatak auksina i citokinina. Ispitivali smo utjecaj sastava šećera u hranidbenoj podlozi, te utjecaj različitih citokinina u različitim koncentracijama na mikropropagaciju. Mjerena svojstva su bila broj izdanaka po eksplantatu, duljina najduljeg izdanka i prosječna duljina svih izdanaka. Na temelju provedenih istraživanja, doneseni su slijedeći zaključci:

Za mikropropagaciju kupine sorte „Reuben“ povoljniji je medij s dodatkom glukoze - PM 2-GLU+SAH, u odnosu na medij samo sa saharozom. Iako je broj izdanaka na ovim medijima bio sličan, duljine izdanaka bile su značajno veće na mediju PM 2-GLU-SAH.

Broj izdanaka po eksplantatu na mediju s BAP-om (2,2) bio je značajno veći nego na mediju s *m*T (1,7) ili na mediju bez regulatora rasta (0,8). Duljine izdanaka nisu se značajno razlikovale obzirom na ova dva citokinina. Najmanji broj, ali najdulji izdanci dobiveni su na mediju bez regulatora rasta.

Uspoređivanjem koncentracija citokinina utvrđeno je da veće koncentracije povise proliferaciju, a smanje duljinu izdanaka.

Analiza mikropropagacije ovisno o kombiniranom učinku vrste i koncentracije regulatora rasta tj. tretmanu pokazuje da je najbolji rezultat dobiven korištenjem BAP-a u obje ispitivane koncentracije. Temeljem dobivenih rezultata zaključujemo da *meta*-Topolin ipak ne predstavlja alternativu BAP-u u mikropropagaciji kupine sorte “Reuben”.

Postotak zakorjenjivanja je bio veći na mediju bez dodatka hormona i iznosio je 61% dok je na mediju s dodatkom IAA iznosio samo 41%.

Aklimatizacija je bila vrlo visoka te ju je preživjelo 92% biljaka zakorijenjenih na HF RM (bez hormona) i 95% biljaka zakorijenjenih na IAA RM.

Rezultati su dokazali da je BAP učinkovitiji od *m*T, te daju prednost korištenju glukoze kao izvora šećera, ali ukazuju i na potrebu daljnjeg istraživanja. Jedno od budućih istraživanja moglo bi se temeljiti na optimizaciji koncentracije BAP-a koja bi dala najbolje rezultate. Ispitivanjem hormona kao što je IBA, mogli bi poboljšati uspjeh zakorjenjivanja.

# 6. Popis literature


1. Anonymus 1, (2008) Springer http://www.springer.com/us/book/9781402063510. Pristupljeno 25.08.2017.
2. Anonymus 2, (2014). Micropropagation. Battistini vivai http://www.battistinivivai.com/en/micropropagazione.php. Pristupljeno 24.08.2017.
3. Borowski V., Mello Farias P. C., Peters J. A. (1996). Micropropagation of Blackberries (Rubus sp.) Cultivars. Rev. Bras. de Agrociencia, v.2, n$^{o1,}$ 17-20
4. Clark R. J. (2008). Primocane-fruiting Blackberry Breeding. Hortiscience vol. 43(6): 1637-1639.
5. Cooper E. R. & Hausman M. G. (2004) Stanica: Molekularni pristup. Medicinska naklada, Zagreb.
6. Debnath S. C. (2003). Micropropagation of small fruits. In: Micropropagation of Woody Trees and Fruits (S.M. Jain, K. Ishii, eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 465-506.
7. Fira A. (2013) The Optimization of Micropropagation Techniques for some Fruit and Ornamental Shrub Cultivars, Summary of PhD Thesis. Cluj-Napoca, Babeș-Bolyai University.
8. Fira A., Clapa D., Catita P. (2009). Micropropagation of Blackberry Thornless Cultivars. Scientific Papers of the R.I.F.G. Vol. XXV: 213-221.
9. Fira A., Clapa D., Plopa C. (2010). New Aspects Regarding the Micropropagation of Blackberry Cultivar 'Thornless Evergreen'. Bulletin UASVM Horticulture, 67(1): 106-114.
10. Fira A., Clapa, D., Simu, M. (2014) Studies Regarding the Micropropagation of some Blackberry Cultivars. Bulletin UASVM Horticulture 71(1): 22-37.
11. Gentile A., Jàquez Gutiérrez M., Martinez J., Frattarelli A., Nota P., Caboni E. (2014) Effect of meta-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in Prunus rootstocks. . Plant Cell, Tissue and Organ Culture 118: 373-381.
12. Google patenti https://www.google.com/patents/USPP23497. Pristupljeno 10.01.2017.
13. Hargreaves plants http://www.hargreavesplants.com/index.php/our-products/commercial-product-range/blackberry-plants. Pristupljeno 10.01.2017.
14. Ilczuk A., Jagiello-Kubiec K., Jacygrad E. (2013) The effect of carbon source in culture medium of common ninebark (*Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim.) "Diable D'or". Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus 12(3): 23-33.
15. Jafar Najaf-Abadi A., Hamidoghli Y. (2009). Micropropagation of thornless trailing blackberry (Rubus sp.) by axillary bud explants. Australian Journal of Crop Science 3(4): 191-194.
16. Jelaska S. (1994). Kultura biljnih stanica i tkiva: temeljna istraživanja i primjena. Zagreb, Školska knjiga.

17. Kaume L., Howard R. L., Devareddy L. (2011). The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry,Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. Journal of agricultural and food chemistry, 60: 5716-5727.
18. Kőszeghi S., Bereczki C., Balog A., Benedek K. (2014) Comparing the Effects of Benzyladenine and meta-Topolin on Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) Micropropagation. Notulae Scientia Biologicae 6(4): 422-427.
19. Lesinger I. (2006) Liječenje voćem (A – L). Rijeka: Adamić, pp. 146-155.
20. Murashige T., Skoog F. (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". Physiologia Plantarum. **15** (3): 473–497.:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x. Pristupljeno 20.09.2017.
21. Podlešáková K., Zalabák D., Čudejková M., Plíhal O., Szüčová L., Doležal K., Spíchal L. (2012) Novel Cytokinin Derivatives Do Not Show Negative Effects on Root Growth and Proliferation in Submicromolar Range. PLoS ONE 7(6):
22. Pritts M. (2008). Primocane-fruiting Raspberry Production. Hortiscience vol. 43(6): 1640-1641.
23. Romano A., Noronha C., Martins- Loução M. A. (1994) Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 159-167.
24. Ružić D., Lazić A. (2006). Micropropagation as Means of Rapid Multiplication of Newly Developed Blackberry and Black Currant Cultivars. Agriculturae Conspectus Scientificus, Vol. 71 No. 4: 149-153.
25. SAS Institute (2010). SAS/STAT software: User's Guide. Version 9.2. SAS Inst., Cary, NC.
26. Štefančić M., Štampar F., Osterc G. (2005) Influence of IAA and IBA on root development and Quality of *Prunus* 'GiSelA 5' leafy cuttings. Hortscience 40(7): 2052-2055.
27. USDA National Nutrient Database for Standard Reference 28 (May 2016)
28. Volčević B. (2008) Jagodičasto voće: jagoda, malina, kupina, borovnica, ribiz, ogrozd, brusnica. Bjelovar: Neron d.o.o.
29. Werbrouck S. P. O., Strnad M., Van Onckelen H. A., Debergh P. C., (1996) *Meta*-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? Physiologia Plantarum 98: 291-297.

# 7. Prilog

## 7.1. Popis slika, tablica i grafova

**Slike:**

Slika 2.1.2.1. Kupina sorte “Reuben”
Slika 4.2.1. Izdanci propagirani na mediju PM 2-SAH i PM 2-GLU+SAH
Slika 4.3.1. Izdanci dobiveni aksilarnim grananjem na MS PM BAP 1
Slika 4.3.2.Izdanci dobiveni aksilarnim grananjem na MS PM mT 1
Slika 4.3.3. Izdanci dobiveni aksilarnim grananjem na MS PM BAP 0,3
Slika 4.3.4.Izdanci dobiveni aksilarnim grananjem na MS PM mT 0,3
Slika 4.4.1. In vitro zakorijenjena biljka na MS HFM
Slika 4.4.2. Aklimatizirane biljke kupine

**Tablice**

Tablica 2.1.1.1. Nutritivne vrijednosti kupine
Tablica 2.2.4.1. Kombinacija mineralnih soli u Murashige i Skoog (1962) hranidbenoj podlozi
Tablica 3.3.1. Sastav medija za uspostavljanje kulture i prvi pokus aksilarnog grananja u ovisnosti o sadržaju šećera
Tablica 3.3.2. Tretmani korišteni u ispitivanju učinkovitosti aksilarnog grananja u ovisnosti o različitim citokininima i njihovim različitim koncentracijama
Tablica 4.2.1. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o sadržaju šećera u mediju
Tablica 4.3.1. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o vrsti regulatora rasta (citokinina) u mediju
Tablica 4.3.2. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o koncentraciji regulatora rasta (citokinina) u mediju
Tablica 4.3.3. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o kombiniranom učinku vrste i koncentracije regulatora rasta (tretmani)

**Grafovi:**

Graf 4.4.1. Postotak zakorjenjivanja na HF RM i IAA RM

## 7.2. Popis kratica

BAP 6-benzilaminopurin
$GA_3$ Giberelinska kiselina
IAA Indolil-3-octena kiselina
IBA Indolil-3-maslačna kiselina
MS Murashige i Skoog medij
mT *Meta*-Topolin

## 7.3. Popis korištenih poveznica


Battistini vivai
http://www.battistinivivai.com/en/micropropagazione.php
Pristupljeno 24.08.2017.
Google patenti
https://www.google.com/patents/USPP23497
Pristupljeno 10.01.2017.
Hargreaves plants
http://www.hargreavesplants.com/index.php/our-products/commercial-product-range/blackberry-plants
Pristupljeno 10.01.2017.
Springer
http://www.springer.com/us/book/9781402063510.
Pristupljeno 25.08.2017.
USDA National Nutrient Database for Standard Reference 28 (May 2016)
https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2161
Pristupljeno 30.06.2017
Wiley Online Library
10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
Pristupljeno 20.09.2017

# Životopis

Martina Zec rođena je 10. 11. 1991. u Monfalcone-u (Italija). Živjela je u Rijeci, a s deset godina se preselila u Matulje gdje je završila osnovnoškolsko obrazovanje.

Prvu Sušačku Hrvatsku Gimnaziju polazila je od 2007. do 2011. godine. U akademskoj godini 2010./2011. upisala je Stručni studij Mediteranske poljoprivrede na Poljoprivrednom odjelu u Poreču, Veleučilišta u Rijeci. Status prvostupnika Mediteranske poljoprivrede stekla je 11.07.2014. godine. Daljnje obrazovanje je nastavila na Agronomskom fakultetu u Zagrebu na smjeru Biljnie znanosti. Za vrijeme školovanja usvojila je osnove ruskog i francuskog jezika.