

Škrob kao indikator zametanja mikrogomolja krumpira (*Solanum tuberosum* L.)

Šilić, Jasmina

Master's thesis / Diplomski rad

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:241880>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

Jasmina Šilić

ŠKROB KAO INDIKATOR ZAMETANJA
MIKROGOMOLJA KRUMPIRA
(*Solanum tuberosum* L.)

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2013.

Ovaj rad, izrađen u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof.dr.sc. Branke Pevalek-Kozlina, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije i kemije.

Mentorici, prof. dr. sc. Branki Pevalek-Kozlina zahvaljujem na stručnom vodstvu, svesrdnoj pomoći, razumijevanju i strpljivosti.

Zahvala na stručnoj pomoći i dr. sc. Jasni Berljak.

Veliko hvala na beskrajnoj strpljivosti, podršci i vjeri u mene, mojim roditeljima, sestri, suprugu i kćerkici Aniki koji su mi pomogli da ovo otvoreno poglavlje moga života uspješno zatvorim.

Jasmina Šilić

Zagreb, 2013.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

ŠKROB KAO INDIKATOR ZAMETANJA MIKROGOMOLJA KRUMPIRA (*Solanum tuberosum* L.)

Jasmina Šilić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Razvitak gomolja krumpira je složeni razvojni proces koji uključuje promjenu razine regulatora rasta, sintezu specifičnih proteina i odlaganje škroba. Formiranje gomolja kontroliraju uvjeti kratkog dana i niske temperature. U uvjetima *in vitro* gomolji se mogu razviti iz pazušnih pupova na stabljici krumpira. U sklopu ovog diplomskog rada istraživano je odlaganje škroba u stanicama bočnih pupova izdanka krumpira (*Solanum tuberosum* L. cv. 'Bintje') kao prvog znaka razvoja mikrogomolja. Biljke korištene u pokusima razmnožavane su nodijskim segmentima na podlozi MS uz dodatak 2% saharoze i 0,8% agara u razmacima od 4 tjedna. Segmenti stabljike presađeni su na podlogu MS modificiranu za razvitak gomolja koja je sadržavala 8% saharoze, 0,8% agara i 22 μ M BA. Kulture su inkubirane na 20 °C u uvjetima kratkog dana (fotoperiod 12 sati). Za histološke analize pupovi su uzimani svaki dan tijekom 14 dana, fiksirani i bojani Lugolovom otopinom (IKI₂) prije uklapanja u glicerol. Prvi znak odlaganja škroba uočen je treći dan pokusa u bazalnom dijelu bočnih pupova na podlozi za tuberizaciju. U eksplantatima uzgajanim u jednakim uvjetima, ali na podlozi bez BA odlaganje škroba nije uočeno niti nakon 14 dana. Četiri dana nakon prve pojave škroba bočni su pupovi zadebljali i tijekom sljedećih dana iz njih su se razvili mikrogomolji. Ovi rezultati potvrđuju važnost visoke koncentracije saharoze i prisutnosti BA u hranjivoj podlozi kao i duljine fotoperioda i temperature u procesu tuberizacije krumpira.

(32 stranice, 7 slika, 1 tablica, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Solanum tuberosum*, mikrogomolj, škrob

Voditelj: prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina

Ocjenjivači: 1. Dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina, red. prof.

2. Dr. sc. Zora Popović, red. prof.

3. Dr. sc. Zdravko Dolenec, red. prof.

Rad prihvaćen: 13. veljače 2013. godine.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

STARCH AS AN INDICATOR OF MICROTUBERIZATION IN THE POTATO (*Solanum tuberosum* L.)

Jasmina Šilić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Formation of potato tubers is a complex developmental system which includes important biological processes such as growth regulator level changes, synthesis of specific proteins and starch deposition. Tuber formation is controlled by short day and low temperature conditions. Axillary buds of potato stem can also produce tubers in *in vitro* conditions. Considering these facts the first sign of starch deposition during early development of microtubers in axillary buds of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. 'Bintje') has been investigated. Potato plantlets used in the experiment were microcloned by nodal segments on MS medium with 2% sucrose and 0.8% agar in 4 week intervals. Stem segments were transferred on mod. MS medium for tuberization supplemented with 8% sucrose, 0.8% agar and 22 μ M BA. Cultures were maintained at 20 °C under short day conditions (12 hr photoperiod). For hystological analysis buds were taken every day for 14 days, fixed and stained with Lugol solution (IKI₂) before embedding in glycerole. The first sign of starch deposition was noticed on day three in the basal part of axillary buds on tuber stimulative medium. In explants grown under same conditions but on medium without BA starch deposition was not noticed even after 14 days in culture. Four days after the occurence of the first starch deposition axillary buds were thickened and formed oval microtubers in next days. This confirms the importance of high sucrose concentrations and BA presence in nutrient medium as well as short photoperiod and temperature in the tuberization process of potatoes.

(32 pages, 7 figures, 1 tables, 43 references, orginal in Croatian)

The graduation thesis deposited in Central Biological Library

Key words: *Solanum tuberosum*, microtuber, starch

Supervisor : dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina, full professor

Reviewers: 1. Dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina, full professor

2. Dr. sc. Zora Popović, full professor

3. Dr. sc. Zdravko Dolenec, full professor

Thesis accepted : February 13, 2013

S A D R Ź A J

1.	UVOD	1
1.1.	Krumpir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	2
1.2.	Podrijetlo krumpira	3
1.3.	Prehrambena vrijednost	3
1.4.	Proizvodnja i gospodarska vrijednost	4
1.4.1	MIKROKLONIRANJE KRUMPIRA	5
1.4.2.	RAZVITAK GOMOLJA KRUMPIRA U UVJETIMA <i>IN VIVO</i>	6
1.4.3.	RAZVITAK GOMOLJA KRUMPIRA U UVJETIMA <i>IN VITRO</i>	7
1.5.	Škrob	9
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3.	MATERIJAL I METODE	13
3.1.	Materijal	13
3.2.	Metode	13
3.2.1.	Tehnike kulture biljnog tkiva	13
3.2.1.1.	STERILIZACIJA INSTRUMENTARIJA I PRIBORA	14
3.2.1.2.	STERILIZACIJA HRANIDBENIH PODLOGA	14
3.2.2.	Sastav hranidbene podloge	15
3.2.3.	Vanjski uvjeti kultura	16
3.2.4.	Histološke tehnike	16
4.	REZULTATI	18
4.1.	Mikrotuberizacija	18

5.	RASPRAVA	25
6.	ZAKLJUČAK	28
7.	LITERATURA	30

1.1. Krumpir (*Solanum tuberosum* L.)

Krumpir (*Solanum tuberosum* L.) je zeljasta trajnica, biljka iz porodice pomoćnica (*Solanaceae*). Čitava biljka krumpira osim gomolja je otrovna jer sadrži otrovni alkaloid, solanin. Stabljika krumpira ima neparno peraste listove, cvjetove i plodove bobice sa sjemenkama i taj nadzemni dio nazivamo cima, a najčešće je visine do 1 m , dok se podzemna stabljika naziva stolon, korijen i gomolj (Sl.1).



Sl.1. Biljka krumpira

Gomolj (jestivi dio biljke) poznat pod nazivom krumpir, modificirani je dio podzemne stabljike stolona. Osim za pohranjivanje pričuvnih tvari služi i za reprodukciju i prezimljenje. Gomolji se razvijaju na vršnom kraju podzemnih plagiotropnih bočnih ogranaka, primarnim rastom većeg broja internodija u debljinu (Lešić i sur. 2002).

1.2. Podrijetlo krumpira

Krumpir potječe iz peruanskih Anda gdje je uzgajan prije više od nekoliko tisuća godina (jug istočnog Perua i sjeverozapadne Bolivije) te je Inkama, uz kukuruz, bio glavna hrana.

U Andama su se razvila dva eko tipa kultiviranog krumpira: ekotip tropskih visoravni - gomolji koji nemaju razdoblje mirovanja i planinski ekotip, kojega gomolji imaju izraženo razdoblje mirovanja. Krumpir obaju ekotipova ima diploidan broj kromosoma ($2n = 24$), a najrasprostranjeniji krumpir Anda jest tetraploidni *S. andigenum* Juz i Buk (Lešić i surad., 2002).

Krumpir koji se danas uzgaja u Europi, u koju su ga prenijeli španjolski istraživači u 16. stoljeću, najviše sličí primitivnim sortama *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, kakav se uzgaja u Čileu. U 18. stoljeću, oko 1779. i 1780. godine u Hrvatsku su ga donijeli graničarski vojnici, dok je u Europi već postao neizostavna hrana (Buturac, 2002).

1.3. Prehrambena vrijednost

Hranidbena i zdravstvena vrijednost krumpira je velika. To je nezaobilazna namirnica koja sadrži oko 25% suhe tvari (različit postotak u različitim kulturama).

Gomolj krumpira sadrži škrob koji je glavni sastojak suhe tvari od 12,7-25%, prosječno od 15-18%, a sadrži još 0,1% masti; 0,2 % kiselina; 0,1% fenolnih spojeva, 1,1 % minerala; 0,6% pektinskih tvari i 1,65% organskih spojeva (nukleinskih kiselina, glikoalkaloida i dr.) te oko 70-84 % vode (Lešić i sur. 2002).

Krumpir ima i zdravstvenu vrijednost - nezaobilazna je namirnica u dijetalnoj prehrani, a preporučuje se kod probavnih smetnji, proljeva, hemeroida, čira na dvanaestercu i žučnih kamenaca, dok se u narodu koriste i oblozi od krumpira (Lešić i sur.2002).

1.4. Proizvodnja i gospodarska vrijednost

Krumpir je biljka umjereno vlažne klime i odgovara mu temperatura bez velikih kolebanja tijekom vegetacije kao i tijekom zimskog mirovanja gomolja u skladištu. Površine na kojima se u Europi uzgaja krumpir su smanjene, ali je znatno porasla proizvodnja u nerazvijenim zemljama. Prinos gomolja tj. broj, krupnoća i kvaliteta ovise o količini i rasporedu padalina tijekom vegetacije.

Krumpir se koristi u ljudskoj prehrani, za industrijsku preradu (sorte s visokim postotkom škroba - za proizvodnju škroba, alkohola, krumpirovog brašna) i za ishranu životinja.

Kultivirani krumpir je tetraploidna biljka koja se razmnožava vegetativno. Nije laka za oplemenjivanje što je uvjetovano visokim stupnjem heterizigotnosti, sterilnošću peluda, osjetljivosti na mnoge bolesti i infekciju virusima (Howard, 1978). Vegetativno razmnožavanje krumpira *in vivo* je klasična metoda razmnožavanja. Za postizanje veće otpornosti krumpira na bolesti, povećanje uroda i kvalitete plodova, odabiranjem i križanjem dobivene su nove sorte krumpira.

Danas se za komercijalno razmnožavanje krumpira koristi razmnožavanje u uvjetima *in vitro* koje je brže, biljke su zdravije, nove sorte se mogu brzo razmnožiti na malom prostoru, a biljke su oslobođene od virusa (Jelaska, 1994).

1.1.1. MIKROKLONIRANJE KRUMPIRA

Metoda razmnožavanja aksilarnim pupovima koristi se za dobivanje klonske populacije i da bi se očuvale somaklonske varijabilnosti (Berljak, 1989).

Mikrokloniranje traži povezanost između istraživanja i proizvodnje, a uspjeh u mikrorazmnožavanju biljaka u širokim razmjerima ovisi o upravljanju i postupanju s kulturama (Jelaska, 1994).

Tehnikom pojedinačnih nodija, tj. nodijskih odsječaka (dio stabljike s bočnim pupom), a na hranidbenoj podlozi odgovarajućeg sastava potiče se rast bočnih pupova. Tako razvijeni izdanci mogu se već nakon četiri tjedna ponovno supkultivirati. Do spontanog stvaranja mikrogomolja u pazuščima listova dolazi ukoliko izdanke ostavimo na podlozi za razmnožavanje dulje od četiri mjeseca bez supkultiviranja (Berljak, 1989).

1.1.2. RAZVITAK GOMOLJA KRUMPIRA U UVJETIMA *IN VIVO*

Tuberizacija je razvitak gomolja krumpira i vrlo je složen biološki proces, tj. razvojni sustav u kome se u uvjetima kratkoga dana, niskih temperatura i visokog omjera ugljika prema dušiku u biljci sintetizira specifična grupa proteina i nakuplja velika količina škroba u vršcima podzemnih stabljika (stolonima). Potom slijedi stvaranje pričuvnih organa, gomolja (Hannapel, 1991).

Opsežna fiziološka istraživanja pokazala su da tuberizaciju kontrolira nekoliko čimbenika kao što su kombinacija hormona, fotoperiod i sastav hranjivih tvari (Vrengduhil i Struik, 1989, Coleman i sur. 2001, Tugrul i Samanci, 2001).

U procesu razvitka gomolja mogu se razlučiti 4 stadija :

(1) poticanje i začetak stolona, prvi vidljivi znak je produžni rast bočnog pupa (poticajno djeluju tama, visoki stupanj vlažnosti i giberelini),

(2) rast stolona - produžni rast i grananje (poticajno djeluju uvjeti dugoga dana, visoke temperature i visoka razina giberelina),

(3) prestanak produžnog rasta stolona (glavnu ulogu ima etilen koji uvjetuje inhibiciju produžnog rasta) i

(4) poticanje i začetak gomolja - citokinini u ovoj fazi djeluju stimulativno (Vreugdenhil i Struik, 1989).

Prema Garner i Blake-u (1989) stvaranje gomolja *in vivo* rezultat je promjene ravnoteže endogenih regulatora rasta te vanjskih utjecaja duljine dana, ishrane dušikom i temperature.

1.1.3. RAZVITAK GOMOLJA KRUMPIRA U UVJETIMA *IN VITRO*

Mikrogomolji se u uvjetima *in vitro* razvijaju iz bočnih meristema, za razliku od uvjeta *in vivo* gdje se razvijaju iz stolona. U kulturi *in vitro* mogu se proizvesti u velikom broju neovisno o sezoni, lako se čuvaju do sadnje i snažni su (Abbott i Belcher, 1986). Najznačajniji su poticaji koji utječu na rast, morfogenezu i tuberizaciju krumpira, svjetlost (fotoperiod, intenzitet, valna duljina), sastav hranidbene podloge i temperatura (Seabrook, 2005).

Sastav hranidbene podloge (saharoza i regulatori rasta) i fotoperiod određuju broj mikrogomolja koji će se razviti - kod povećane koncentracije saharoze (s 3% na 9%) u uvjetima kratkoga dana reducira se rast stabljike i stimulira stvaranje gomolja. Visoku koncentraciju saharoze i njenu važnost u hranidbenoj podlozi za stvaranje mikrogomolja opisali su Wang i Hu (1982), Hussey i Stacy (1984) i Abbott i Belcher (1986). El-Sawy i sur. (2007) dokazuju da je saharoza važan čimbenik za stvaranje mikrogomolja, a najveći gomolj razvio se na podlozi s dodatkom 12% saharoze i 4 mg/L kinetina.

Kvantitativno povećanje tuberizacije u uvjetima kratkoga dana Woolley i Wareing (1972) pripisuje povećanju sadržaja citokinina, a Smith i Rappaport (1969) smanjenju sadržaja endogenih giberelina uvjetovanom kratkim danom. Ako se podlozi za tuberizaciju doda kinetin i paklobutrazol dolazi do pojačanog stvaranja gomolja (Šimko, 1993). Po Abbott i Belcher-u (1986) uvjeti dugoga dana koče tuberizaciju.

Slimmon i sur. (1989) su istraživali ovisnost tuberizacije o fotoperiodu i došli do spoznaje da se kod 8-satnog osvjetljenja gomolji razvijaju sporije nego u tami, ali su nakon 12 tjedana njihova težina i promjer značajno veći nego u gomolja razvijenih u tami.

Pri temperaturi od 26 °C inhibira se tuberizacija tj. prestaje stvaranje mikrogomolja (Harvey i sur., 1992), a iste su rezultate o prestanku formiranja gomolja pri temperaturi od 26 °C do 29 °C dobili Buturac i Bolf (2000).

Hannapel (1991) je uočio, promatrajući nakupljanje škroba i promjenu težine svježe tvari tijekom procesa tuberizacije da je došlo do povećanja težine svježe tvari i sadržaja škroba u bočnim pupovima nakon drugog dana kulture. Četvrtoga dana nakon početka inkubacije postale su vidljive prve morfološke promjene, dok je porast težine svježe tvari bio spor do

osmoga dana, a vrlo brz od 8. do 14. dana, što se podudaralo s brzim nakupljanjem škroba. Šesti je dan postalo vidljivo stvaranje gomolja, a opažen je i porast ukupnih proteina i ukupne RNA.

Mitoza i odlaganje škroba su najranije vidljive anatomske promjene povezane sa začetkom gomolja. Stvaranje gomolja povezano je s dvije biokemijske promjene:

(1) nakupljanjem škroba i

(2) nastankom novih proteina (inhibitora proteaza i patatina).

Dan prije vidljivog nabreknuća bočnog pupa, Visser i sur. (1994) su utvrdili ekspresiju gena za sintezu škroba, te povećanu aktivnost enzima saharoza-sintaze i ADPG-pirofosforilaze.

1.5. Škrob

Škrob je biljna pričuvna tvar koja se nakuplja u sjemenkama (žitarice) i gomoljima (krumpir), a može se razgraditi na dva različita spoja, amilozu i amilopektin.

Amiloza čini 20-30% prirodnog škroba. Sastoji se od mnogobrojnih ostataka glukoze (250-300), koji su međusobno povezani α -1,4-glikozidnom vezom. Glikozidni C-atom (reducirajući kraj) molekule je na jednom kraju, dok je C-atom s hidroksilnom grupom (nereducirajući kraj) na drugom kraju. Maltoza je osnovna jedinica, a između njih je opet α -1,4-glikozidna veza i zbog njih je to lančasta molekula u obliku uzvojnice (Lutkić i Jurić, 2008). S otopinom I₂-KI (Lugolova otopina) daje karakteristično obojenje koje je posljedica ulaganja molekularnog joda u spiralu. Dolazi do snažne apsorpcije dugovalnog zračenja i pojavljuje se plavičasto obojenje kompleksa škroba s jodom.

Amilopektin je razgranana molekula, drugi sastavni dio prirodnoga škroba, izgrađena kao i amiloza od α -glikozidno povezanih glukoza, samo su kod amilopektina za razliku od amiloze na glavnom lancu razmješteni bočni lanci povezani α -1,6-vezama na koje se ponovno nadovezuju bočni lanci. Do grananja dolazi u prosjeku nakon svakih 25 jedinica glukoze. S otopinom I₂-KI daje slabo ljubičasto do ružičasto obojenje.

Hidrolizom škrob se razgrađuje na manje dijelove, a oni se dalje razgrađuju do glukoze.

Škrob se sintetizira u kloroplastima i amiloplastima, a sinteza počinje od viška trioza fosfata stvorenog u Calvinovom ciklusu. Ovaj je spoj početni i u sintezi saharoze. Sinteza škroba i saharoze su kompetitivni procesi. Razdioba trioza fosfata između sinteze škroba (kloroplasti) i sinteze saharoze (citosol), regulirana je koncentracijom ortofosfata (Pi), ako je visoka sintetizira se saharoza, a kada je niska, sintetizira se škrob.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog diplomskog rada bio istražiti povezanost odlaganja škroba u stanicama bočnih pupova izdanaka krumpira (*Solanum tuberosum* L. cv. *Bintje*) i razvoja mikrogomolja u uvjetima kratkoga dana (12 h svjetlosti /12 h tame) pri temperaturi 20 °C.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Materijal

Iz ustaljene kulture izdanaka krumpira (*Solanum tuberosum* L. cv. *Bintje*) uzgojenih na podlozi MS (Murashige i Skoog, 1962) s dodatkom 2% saharoze, 0,8% agara i 1 gl⁻¹ hidrolizata kazeina u uvjetima kratkoga dana na temperaturi 20 °C koristila sam nodijske odsječke. Nakon šest tjedana u kulturi kada su biljčice razvile 6-8 nodija, odrezala sam im vršni dio i korijen te takve nodijske segmente posadila na podlogu za tuberizaciju.

3.2. Metode

3.2.1. Tehnike kulture biljnoga tkiva

U radu sam koristila aseptičke tehnike kulture biljnoga tkiva opisane u monografijama Whitea (1963) i Streeta (1977). Biljke sam presađivala u aseptičkim uvjetima u komori s horizontalnim protokom sterilnoga zraka (Laminar Flow Equipment).

3.2.1.1. STERILIZACIJA INSTRUMENTARIJA I PRIBORA

Stakleni pribor sam sterilizirala u autoklavu pri 0,2 MPa i 120 °C u trajanju 45 minuta, dok sam metalni pribor (skalpele, pincete) sterilizirala neposredno prije uporabe uranjanjem u 96%-tni etanol i spaljivanjem na plameniku.

3.2.1.2. STERILIZACIJA HRANIDBENIH PODLOGA

Nakon što sam hranidbene podloge raspodijelila u epruvete, sve sam zajedno sterilizirala u autoklavu pri 0,15 MPa i 120 °C u trajanju od 20 minuta.

3.2.2. Hranidbene podloge

Koristila sam hranidbenu podlogu MS (Murashige i Skoog, 1962). U tablici 1. prikazan je sastav hranidbene podloge.

Tablica 1. Sastav hranidbene podloge MS

MS (Murashige i Skoog, 1962)		
MAKROELEMENTI :	mg l ⁻¹	mM
KNO ₃	1900	18,80
NH ₄ NO ₃	1650	20,60
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	2,99
KH ₂ PO ₄	170	1,25
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	180,7	0,73
MIKROELEMENTI	mg l ⁻¹	mM
H ₃ BO ₃	6,2	100,0
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025	0,1
KI	0,83	5,0
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25	1,0
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	0,1
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,3	100,0
ZnSO ₄ x 4 H ₂ O	8,6	29,9
ŽELJEZO	mg l ⁻¹	mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8	100,0
Na ₂ EDTA	37,3	100,0
ORGANSKI DODACI	mg l ⁻¹	mM
glicin	2,0	26,6
m- inozitol	100,0	550,0
nikotinska kiselina	0,5	4,1
piridoksin HCl	0,5	2,4
tiamin HCl	0,1	0,3

U podlogu za mikrorazmnožavanje dodala sam 20 g l^{-1} saharoze (2%), 8 g l^{-1} agara (0,8%) i 1 g l^{-1} hidrolizata kazeina. U podlogu za tuberizaciju sam dodala 80 g l^{-1} saharoze (8%), 8 g l^{-1} agara (0,8%), organske dodatke: m-inozitol (100 mg l^{-1}), biotin ($0,2 \text{ mg l}^{-1}$), folnu kiselinu ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$), tiamin, HCl ($0,2 \text{ mg l}^{-1}$), te citokinin benzilaminopurin (BA, $22 \text{ } \mu\text{M}$). Kontrolna podloga nije sadržavala BA.

pH vrijednost podloga podešavala sam na 5,8-6,0 dodatkom 0,5 M otopine NaOH prije dodavanja agara i saharoze. Podloge sam pripremala 24 sata prije nasađivanja.

Za pokuse sam upotrebljavala epruvete veličine $30 \times 160 \text{ mm}$ punjene s 10 ml medija, začepljene vatom i aluminijskom folijom. Nasađivala sam po dva eksplantata u svaku epruvetu.

3.2.3. Vanjski uvjeti kultura

Kulture nodijskih odsječaka inkubirala sam u uvjetima 12-satnog osvjetljenja bijelom svjetlošću (fluorescentne cijevi TEŽ-Zagreb, 40W, $80 \text{ } \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) na temperaturi $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a kulture za poticanje razvoja mikrogomolja u uvjetima 12-satnog osvjetljenja ili u tami na $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4. Histološke tehnike

Tijekom dva tjedna sam za histološku analizu uzimala svaki dan bočne pupove i fiksirala ih u fiksativu FAO (formaldehid, ledena octena kiselina i etanol u omjeru 90 : 5 : 5). Radila sam uzdužne prereze kroz bočne pupove s pripadajućim dijelom stabljike, a najmanje 24 sata nakon toga ih bojala Lugolovom otopinom (1 g joda i 2 g KI u 100 ml destilirane vode, razrijeđeno u omjeru 1 : 3) te ih potom uklapala u glicerol (Gerlach, 1977).

4. REZULTATI

Istraživanja koja sam provela na izdancima krumpira imala su za cilj pokazati povezanost stvaranja škroba u stanicama bočnih pupova izdanaka krumpira i razvitka mikrogomolja u ovisnosti o egzogeno dodanom citokininu (BA) u uvjetima kratkoga dana i temperature 20 °C.

4.1. MIKROTUBERIZACIJA

Biljčicama krumpira koje su se razvile na podlozi za mikrorazmnožavanje (sl. 2) odrezala sam vršak i korijen te dobivene nodijske segmente nasadila na podlogu za tuberizaciju - MS uz dodatak 8% saharoze, 0,8% agara i 22 μ M BA. Kao kontrolnu podlogu koristila sam podlogu istog sastava, ali bez dodatka citokinina.

Nakon što sam biljne eksplantate u sterilnim uvjetima nasadila na podlogu za tuberizaciju, dio sam biljnih kultura inkubirala u uvjetima kratkoga dana, a dio u tami, četrnaest dana pri temperaturi od 20° C.

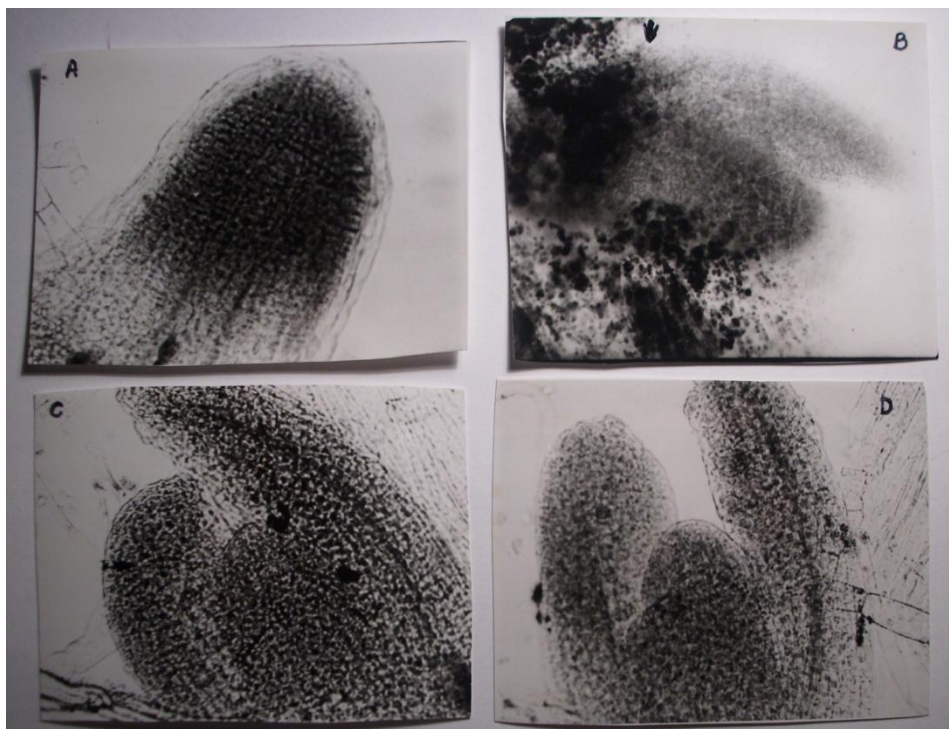
Od prvoga dana inkubacije, svakoga dana sam tijekom dva tjedna, fiksirala pojedinačne izdanke u fiksativu FAO. Fiksacija je trajala najmanje 24 sata. Kroz tako fiksirane bočne pupove s pripadajućim dijelom stabljike načinila sam tanke uzdužne prereze. Prereze sam tada bojala Lugolovom otopinom, uklapala ih u glicerol i promatrala mikroskopom.



Sl.2. Izdanci krumpira, kultura stara 4 tjedna (MS medij s 2% saharoze i 0,8% agara)

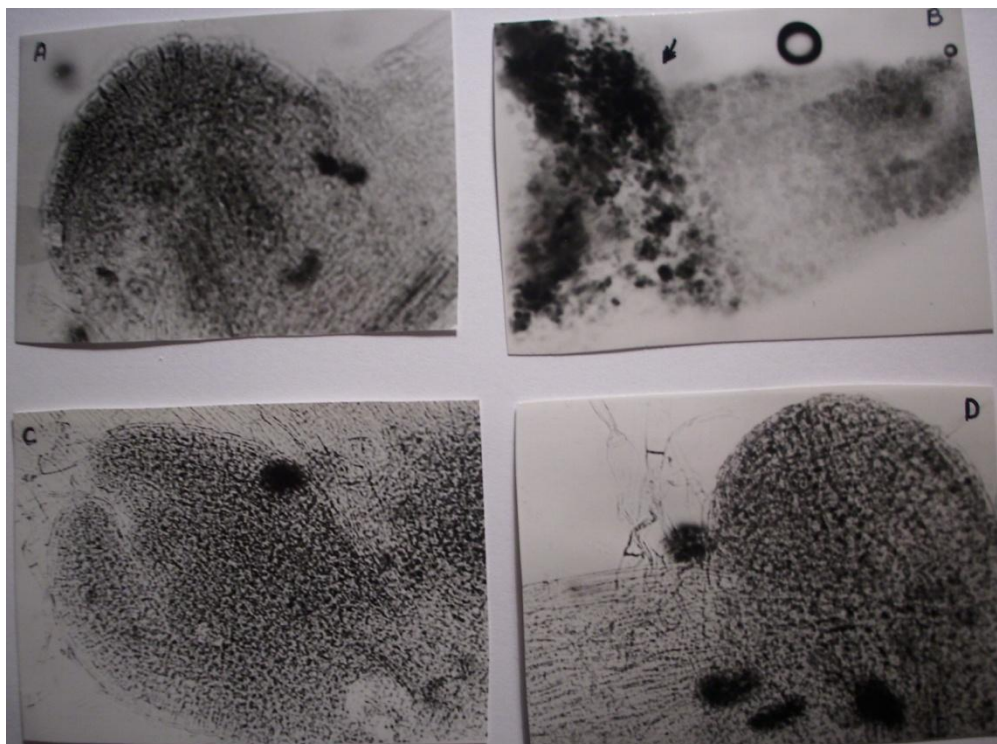
Prvo nakupljanje škrobnih zrnaca u bočnim pupovima izdanka na podlozi za tuberizaciju (MS 8% saharoze, 0,8% agara i 22 μ M BA) u uvjetima kratkoga dana uočila sam 3. dana kulture (sl. 3B) i kod biljaka na svjetlosti i kod onih u tami.

Kod biljaka na kontrolnom mediju tijekom inkubacije od 14 dana bez obzira da li su inkubirane na svjetlosti ili u tami nije bilo nakupljanja škroba u bočnim pupovima (Sl.3D).



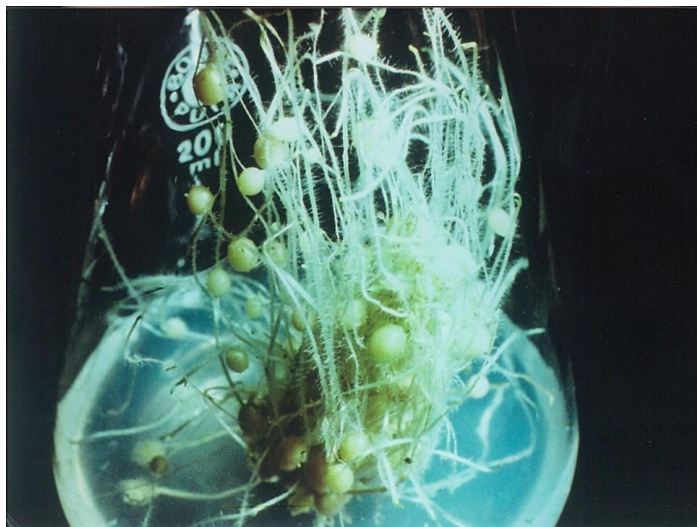
Sl. 3. Uzdužni prerez kroz bočni pup krumpira na podlozi za tuberizaciju (8% saharoze, 0,8 % agara i 22 μ M BA) u uvjetima kratkog dana na 20 °C: **A** - prvi dan kulture, **B** - treći dan kulture (nakupljeni škrob označen strelicom) i na kontrolnom mediju (8% saharoze, 0,8% agara): **C** - prvi dan kulture, **D** - treći dan kulture.

Prvo vidljivo nabreknuće bočnih pupova, mikrogomolje, uočila sam 7. dana i kod biljaka u tami i kod biljaka na svjetlosti. Kod biljaka u tami mikrogomolje sam uočila na 2. i 3. nodiju, u pazušcu lista, a kod biljaka na svjetlosti na 1. nodiju, u uvjetima kratkoga dana (12 sati svjetlosti /12 sati tame i temperature 20 °C), na izdancima krumpira uzgajanih na podlozi za tuberizaciju.



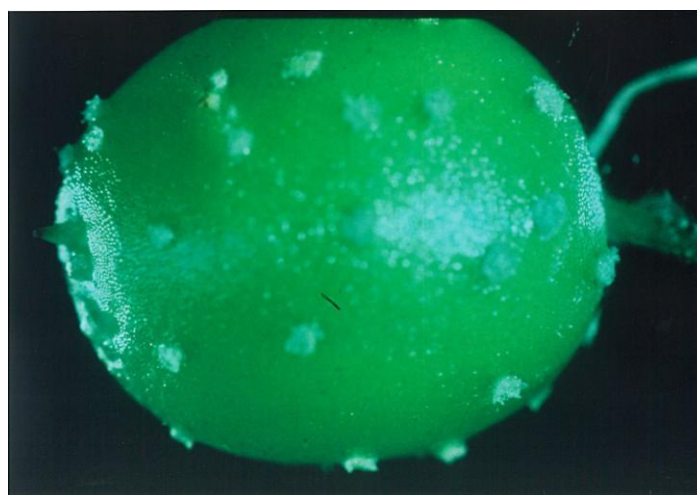
Sl. 4. Uzdužni prerez kroz bočni pup krumpira na podlozi za tuberizaciju (8% saharoze , 0,8 % agara i 22 μ M BA) u tami na 20 °C: **A** - prvi dan kulture, **B** - sedmi dan kulture (nakupljeni škrob označen strelicom) i na kontrolnom mediju (8% saharoze, 0,8% agara): **C** - prvi dan kulture, **D** - sedmi dan kulture.

Četiri mjeseca nakon inkubacije, razvijeni mikrogomolji, u uvjetima kratkoga dana imali su promjer između 5 i 10 mm (Sl. 5).



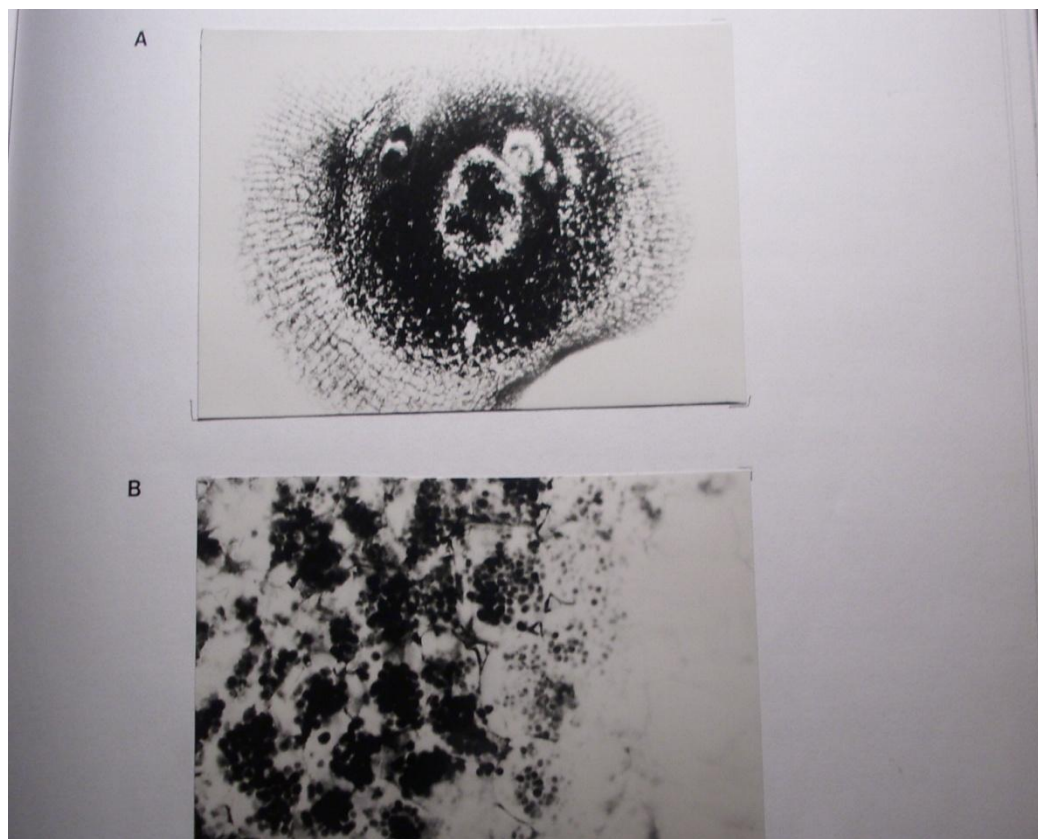
Sl. 5. Mikrogomolji krumpira inducirani na podlozi MS s8% saharoze, 0,8% agara i 22 μ M BA u uvjetima kratkog dana i 20°C. Starost kulture 4 mjeseca.

Anatomska građa mikrogomolja je bila slična normalnim gomoljima pa se tako na apikalnom dijelu mogao uočiti vršni meristem, tzv. okce, iz kojeg će se razviti izdanak (Sl. 6), dok je građa epiderme s dobro razvijenim lenticelama odgovarala kori normalnog gomolja.



Sl.6. Mikrogomolj krumpira s vršnim meristemom na apikalnom dijelu i dobro razvijenim lenticelama (povećanje 15 $\times$).

Na prerezu mikrogomolja obojenom Lugolovom otopinom mogle su se dobro uočiti velike spremišne (parenhimske) stanice ispunjene škrobnim zrnima (Sl. 7).



Sl. 7. Prerez mikrogomolja krumpira razvijenog na podlozi za tuberizaciju u uvjetima kratkoga dana na 20°C. Kultura stara 4 mjeseca.

A - povećanje 10×

B - povećanje 80×

Istraživanje provedeno na izdancima krumpira (*Solanum tuberosum* L. cv. *Bintje*) dalo je rezultate koji potvrđuju važnost visoke koncentracije saharoze (8%) i prisutnost regulatora rasta (citokinina) u hranidbenoj podlozi, a isto tako i važnost duljine fotoperioda (kratki dan: 12 sati svjetlosti /12 sati tame) i temperature (20 °C) u procesu mikrotuberizacije.

Rezultati koje sam dobila ovim istraživanjem potvrđuju tvrdnju znanstvenika Hannapela (1991) koji je utvrdio da je upravo nakupljanje škroba u bočnim pupovima izdanka krumpira prvi pokazatelj početka procesa tuberizacije jer prethodi vidljivim znacima morfoloških promjena. Naime, i u mojim istraživanjima pojava nakupljanja škroba u pupovima prethodila je vidljivom nabreknuću pupova i njihovom daljem razvoju u mikrogomolje.

Pojavu škroba sam pratila u pupovima krumpira kultiviranim na podlozi za tuberizaciju (MS s 8% saharoze, 0,8% agara i 22 μ M BA) i na kontrolnom mediju (MS s 8% saharoze, 0,8% agara bez citokinina) inkubiranim na temperaturi 20°C u uvjetima kratkoga dana ili u tami.

Prvo nakupljanje škroba u pupovima izdanaka krumpira nasadenim na podlogu za tuberizaciju uočila sam 3. dana u biljkama inkubiranim u uvjetima kratkoga dana i u biljkama inkubiranim u tami. U biljkama uzgajanim na kontrolnoj podlozi bez citokinina niti nakon dva tjedna inkubacije nisam uočila pojavu škrobnih zrnaca.

Hannapel (1991) je u jednakim uvjetima uočio nakupljanje škroba drugi dan nakon nasađivanja, a prvi se vidljivi znak morfoloških promjena pojavio četvrti dan.

Berljak i Pevalek-Kozlina (1994) izvještavaju da se u pupovima krumpira uzgajanog na MS podlozi za tuberizaciju u uvjetima dugoga dana i pri 26 °C škrob počeo nakupljati 8. dan, a u kulturama inkubiranim u tami 12. dan u kulturama, dok na kontrolnoj podlozi niti nakon dva tjedna nije bilo škrobnih zrnaca. U usporedbi s rezultatima mojih pokusa to ukazuje da uvjeti kratkoga dana djeluju stimulirajuće na tuberizaciju. Suprotno tome Hussey i Stacy (1984) ističu da je u njihovim pokusima 8-satno osvjetljenje stimuliralo vegetativni rast, a uvjeti 16-satnog ili 24-satnog osvjetljenja djelovali povoljno na tuberizaciju.

Brojni znanstvenici istraživali su učinak koncentracije saharoze na poticanje razvoja mikrogomolja krumpira. Tako su Wang i Hu (1982), Hussey i Stacey (1984), Abbott i Belcher (1986) te Garner i Blake (1989), koristili su istu visoku koncentraciju saharoze u podlozi (8%) koja se pokazala povoljnom za stvaranje mikrogomolja.

El-Sawy i sur. (2007) su svojim istraživanjima potvrdili da je saharoza važan čimbenik u poticanju procesa mikrotuberizacije. U svojim su pokusima u podlogu dodavali čak 12% saharoze. Kada su podlozi uz tako visoku koncentraciju saharoze dodali 4 mg/L kinetina razvijali su se najveći mikrogomolji.

Rezultati provedenih istraživanja potvrdili su da duljina dana i sastav hranidbene podloge, posebice koncentracija saharoze i dodatak citokinina imaju važnu ulogu u procesu zametanja i razvitka mikrogomolja krumpira.

6. ZAKLJUČAK

Izdanke krumpira sa 7-8 nodija (*Solanum tuberosum* L. cv. *Bintje*) uzgajala sam na podlozi za tuberizaciju (MS s dodatkom 8% saharoze, 0,8 % agara i 22 μ M BA) te na kontrolnom mediju koji nije sadržavao citokinin u uvjetima kratkog dana (12 sati svjetlosti / 12 sati tame) i u tami pri temperaturi 20°C.

Na temelju rezultata istraživanja povezanosti odlaganja škroba u stanicama bočnih pupova izdanaka krumpira i razvitka mikrogomolja iz tih pupova mogu zaključiti sljedeće:

- U pupovima izdanaka krumpira uzgajanih na podlozi za tuberizaciju pri temperaturi 20°C škrob se u bočnim pupovima počeo nakupljati 3. dan nakon nasađivanja i u izdancima uzgajanim u uvjetima kratkog dana i u izdancima uzgajanim u tami.
- Prvi vidljivi znak razvitka mikrogomolja uočila sam 7. dan nakon nasađivanja i u izdancima uzgajanim u uvjetima kratkog dana i u izdancima uzgajanim u tami.
- Nakon četiri mjeseca kultiviranja razvijeni mikrogomolji bili su i morfološki i anatomske slični normalnim gomoljima krumpira.
- Na kontrolnom mediju koji nije sadržavao citokinin niti nakon 14 dana kultiviranja u uvjetima kratkog dana i tame nisam uočila nakupljanje škroba u bočnim pupovima kao ni povećanje pupova koje prethodi razvitku mikrogomolja.

7. LITERATURA

ABBOTT, A. J. and BELCHER, A. R., 1986. Potato tuber formation *in vitro*. U: L. A. Withers and P. G. Alderson (Eds.): Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications. Butterworths, London, pp. 113-122.

BERLJAK, J., 1989. Somaklonska varijabilnost u kulturama stanica i protoplasta vrste *Solanum tuberosum* L. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

BERLJAK, J. and PEVALEK-KOZLINA, B., 1994. Starch deposition-an early event of microtuberization in the potato (*Solanum tuberosum* L. cv. *Bintje*). Period. Biol. 96 (4): 405-406.

BUTURAC, I., BOLF, M., 2000. Proizvodnja krumpira, Multigraf, Zagreb

EL-SAWY, A., BEKHEET, S. and ALY UI 2007. Morphological and molecular characterization of potato microtubers production on coumarin iducing medium. In J Agri Biol. 9(5):675-680 <http://www.fspublishers.org>

GARNER, N. and BLAKE, J. 1989. The induction and development of potato microtubers in vitro on media free of growth regulating substances. Ann. Of Bot. 63: 663-674.

GERLACH, D., 1977. Botanische Mikrotechnik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

HANNAPEL, D. J., 1991. Characterization of the early events of potato tuber development. Physiol. Plant. 83: 568-573.

HARVEY, B. M. R., CHROTHERS, S. H., EVANS, N. E. and SELBY, C.,1991. The use of growth retardants to improve microtuber formation by potato (*Solanum tuberosum*). Plant Cell,Tissue and Organ Culture 27: 59-64.

HARVEY, B. M. R.,CROTHERS, S. H., WATSON, S. and LEE, H. C., 1992. Heat inhibition of tuber development in potato (*Solanum tuberosum* L): effects on microtuber formation *in vitro*. Potato Res. 35: 183-190

HOWARD, H. W., 1978.The production of new varieties. U: P: M. Harris (Ed.): The Potato. Halsted Press, New York, pp. 607-646

HUSSEY, G. and STACY, N. J., 1984. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). Ann. Of Bot. 53: 565-578.

JELASKA, S., 1994.: Kultura biljnih stanica i tkiva. Školska knjiga, Zagreb.

LEŠIĆ,R., BOROŠIČ,J., BUTURAC,I., ĆUSTIĆ,M., POLJAK,M., ROMIĆ,D., 2002.: Povrćarstvo, Zrinski d. d. , Čakovec

LUTKIĆ, A., JURIĆ, A., 2008.: Biokemija Medicinska naklada, Zagreb.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

SEABROOK JEA, 2005. Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: a review. *Am J Potato Res* 82: 353-367

SLADKY, Z. and BARTOŠOVA, L., 1990. *In vitro* induction of axillary potato microtubers and improvement of their quality. *Biol. Plant.* 32 (3): 181-188.

SLIMMON, T., SOUZA MACHADO, V. AND COFFIN, R., 1989. The effect of light on *in vitro* microtuberization of potato cultivars. *Am. Potato j.* 66: 843-848.

SMITH, O. E. and RAPPAPORT, L. 1969. Gibberellins, inhibitors, and tuber formation in the potato, *Solanum tuberosum* L. *Am. Potato J.* 46: 185-191.

STREET, H. E., 1977. *Plant Tissue and Cell Culture*. 2nd Ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

ŠIMKO, I., 1993. Effects of kinetin, paclobutrazol and their interactions on the microtuberization of potato stem segments cultured *in vitro* in the light. *Plant Growth Regulation* 12: 23-27.

TAYLOR, M. A., MAD ARIF, S. A., KUMAR, A., DAVIES, H. V., SCOBIE, L. A., PEARCE, S. R. and FLAVELL, A. J., 1992. Expression and sequence analysis of cDNAs induced during the early stages of tuberization in different organs of the potato plant (*Solanum tuberosum* L.) *Plant Mol. Biol.* 20: 641-651.

VISSER, R. G. F., VREUGDENHILL, d., HENDRIKS, T. and JACOBSEN, E., 1994. Gene expression and carbohydrate content during stolon to tuber transition in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 90: 285-292.

VREUGDENHIL, D. and STRUIK,P. C., 1989. An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 75: 525-531.

WANG, P. J. and HU, C., Y., 1982. *In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. Am. Potato J. 59: 33-39.

WHITE, P. R., 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cells. 2nd Ed. Ronald Press, New York.

WOOLLEY, D. J. and WAREING, P. F., 1972. The interaction between growth promoters and apical dominance. II. Environmental effects on endogenous cytokinin and gibberellin levels in *Solanum andigena*. New Phytol. 71: 1051-1025.