# Uspješnost zakorjenjivanja kapara (Capparis orientalis Veill.) ovisno o predtretmanu citokininima

**Koščec, Ena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:204:813631

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

*Repository / Repozitorij:*

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

# Uspješnost zakorjenjivanja kapara (*Capparis orientalis* Veill.) ovisno o predtretmanu citokininima

DIPLOMSKI RAD

Ena Koščec

Zagreb, rujan 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Biljne znanosti

# Uspješnost zakorjenjivanja kapara (*Capparis orientalis* Veill.) ovisno o predtretmanu citokininima

DIPLOMSKI RAD

Ena Koščec

Mentor:

doc. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović

Zagreb, rujan 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

# IZJAVA STUDENTA
## O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ena Koščec**, JMBAG 0178105197, rođena 05.06.1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Uspješnost zakorjenjivanja kapara (*Capparis orientalis* Veill.) ovisno o predtretmanu citokininima

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 studenta / studentice*

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

# IZVJEŠĆE
## O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice Ena Koščec, JMBAG 0178105197, naslova

Uspješnost zakorjenjivanja kapara (*Capparis orientalis* Veill.) ovisno o predtretmanu citokininima

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

| Povjerenstvo: | | | potpisi: |
|---|---|---|---|
| 1. | doc. dr .sc. Anita Bošnjak Mihovilović | mentor | _____ |
| 2. | prof. dr. sc. Snježana Kereša | član | _____ |
| 3. | doc. dr. sc. Ivanka Habuš Jerčić | član | _____ |

*Zahvaljujem,*

*profesorici Snježani Kereša i mentorici Aniti Bošnjak Mihovilović na vodstvu tijekom laboratorijskog istraživanja i pisanja diplomskog rada. Hvala Vam na strpljenju, prenesenom znanju i podršci!*

*Posebno i veliko HVALA mojim roditeljima na bezuvjetnoj vjeri u mene u svakom trenutku. Zbog vas sam kompletna osoba danas!*

*Mom bratu Mateu što me naučio da ponekad treba naučiti i za 2 jer je bitnije ono znanje koje kasnije nosiš sa sobom, a ne ocjene.*

*Mojoj Nini na svim suzama, bilo u teškim ili sretnim trenucima – hvala što si uvijek tu i čuvaš mi leđa.*

*Mojim bakama i djedovima koji su upisivali datume svih mojih ispita u kalendar i strepili, a prvi nazvali da provjere kako je prošlo. Uvijek ću pamtiti legendarno pitanje: „Ti mogu čestitat, jel petica?“.*

*Mom Fići na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog mog studiranja, strpljenju i bodrenju.*

*I na kraju, hvala svim profesorima i ovom prekrasnom fakultetu što me odgojio, naučio prave vrijednosti i donio mi posebno prijateljstvo – moju Miu. Prijateljicu i oslonac za cijeli život.*

# SADRŽAJ

1. UVOD ..... 1
1.1. Cilj i hipoteza istraživanja ..... 2
2. PREGLED LITERATURE ..... 3
2.1. Taksonomija i rasprostranjenost kapara ..... 3
2.1.1. Rasprostranjenost u Hrvatskoj ..... 4
2.2. Morfološke karakteristike kapara ..... 6
2.3. Biološka svojstva i ekološki zahtjevi ..... 7
2.4. Razmnožavanje kapara ..... 8
2.5. Kemijski sastav i primjena ..... 9
2.5.1. Upotreba u kulinarstvu ..... 10
2.6. Kultura tkiva ..... 11
2.6.1. Kapari u kulturi tkiva ..... 12
2.7. Biljni regulatori rasta ..... 13
2.8. Citokinini ..... 14
2.8.1. Meta-topolin i 6-benzilaminopurin ..... 15
2.9. Auksini ..... 17
2.9.1. Indol-3-maslačna kiselina ..... 18
3. MATERIJALI I METODE ..... 19
3.1. Biljni materijal ..... 19
3.2. Sterilizacija biljnog materijala ..... 19
3.3. Autoklaviranje i sterilizacija instrumenata ..... 19
3.4. Rad u laminaru i komora rasta ..... 20
3.5. Priprema hranjive podloge ..... 20
3.5.1. Medij za multiplikaciju ..... 21
3.5.2. Medij za zakorjenjivanje ..... 23
3.6. Statistička analiza podataka ..... 24
4. REZULTATI I RASPRAVA ..... 25
4.1. Uspješnost multiplikacije ovisno o citokininima ..... 25
4.2. Utjecaj citokinina korištenih u fazi multiplikacije i tretmana zakorjenjivanja na uspješnost zakorjenjivanja ..... 26
4.2.1. Utjecaj citokinina korištenih u fazi multiplikacije izdanaka i tretmana s IBA-om na uspješnost zakorjenjivanja ..... 26

4.2.2. Utjecaj citokinina korištenih u fazi multiplikacije i tretmana bez dodatka auksina na uspješnost zakorjenjivanja ..... 28
4.3. Utjecaj citokinina korištenih u fazi multiplikacije izdanaka i tretmana za zakorjenjivanje na karakteristike korijena ..... 29
4.4. Aklimatizacija ..... 31
5. ZAKLJUČAK ..... 33
6. LITERATURA ..... 34
Popis kratica ..... 37
Životopis ..... 38

# Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ena Koščec**, naslova

**Uspješnost zakorjenjivanja kapara (*Capparis orientalis* Veill.) ovisno o predtretmanu citokininima**

Grm kapara (*Capparis orientalis* Veill.) samonikla je biljna vrsta čije stanište najviše vežemo uz mediteransko područje gdje se najviše i prirodno proširila. Ova biljna vrsta ima vrlo male zahtjeve prilikom uzgoja. Otporna je na sušna razdoblja i manjak vode te razvija vrlo snažan i dubok korijen. Zbog značajnih aromatičnih i ljekovitih svojstava sve više raste interes za komercijalni uzgoj kapara. Problem prilikom uzgoja je otežano zakorjenjavanja ove vrste. Danas se sve više primjenjuje način razmnožavanja u *in vitro* aseptičkim uvjetima, tzv. mikrorazmnožavanje što bi moglo biti potencijalno riješenje za razmnožavanje ove i mnogih drugih biljnih vrsta. Na taj način moguće je umnožiti matičnu biljku u kontroliranim uvjetima i na mediju točno određenog sastava prilagođenog vrsti koja se uvodi u kulturu. U cilju poboljšanja zakorjenjivanja u ovom istraživanju kapar je uveden u kulturu gdje je prvo multipliciran na mediju s dva različita regulatora rasta. Korišteni su citokinini, 6-benzilaminopurin (BAP) i meta-topolin (mT) u četri različite koncentracije. Nakon postignutog željenog broja eksplantata na hranjivom mediju za multiplikaciju, izdanci kapara postavljeni su na medij za zakorjenjivanje s auksinom indolil-3-maslačnom kiselinom (IBA) i kontrolni medij bez dodatka hormona. Cilj provedenog istraživanja bio je istražiti uspješnost zakorjenjivanja kapara ovisno o korištenim citokininima u fazi multiplikacije izdanaka. Rezultatima je utvrđeno da nema značajne razlike između BAP-a i mT-a u procesu zakorjenjivanja, dok je veći postotak uspješno aklimatiziranih biljaka bio kod biljaka formiranih na mediju s mT.

**Ključne riječi:** kapar, *capparis*, *in vitro*, mikrorazmnožavanje, regulator rasta

# Summary

Of the master's thesis – student **Ena Koščec,** entitled

**Success of rooting of capparis (*Capparis orientalis* Veill.) dependent of cytokinin pretreatment**

Caper bush (*Capparis orientalis* Veill.) is a wild plant species whose habitat is most closely associated with the Mediterranean area where it has spread most natural. This plant species has very low growing requirements. It is resistant to drought and lack of water and develops a very strong and deep root. Due to its significant aromatic and medicinal characteristics, there is a growing interest in commercial caper cultivation. The problem with cultivation is difficult rooting of this species. Today, the method of propagation in *in vitro* aseptic conditions, the so-called micropropagation which could be a potential solution for the propagation of this and many other plant species. In this way, it is possible to propagate the mother plant under control conditions and on a medium of precisely defined composition adapted to the species being introduced into the culture. In order to improve rooting in this study, caper has been introduced into the culture where it first multiplied on a medium with two different growth regulators. Cytokines, 6-benzylaminopurine (BAP) and meta-topoline (mT) were used in four different concentrations. After achieving the desired number of explants on the multiplication nutrient medium, the caper shoots were placed on the rooting medium with auxin indolyl-3-butyric acid (IBA) and the control medium without the addition of hormones. The aim of the study was to investigate the success of rooting of capers independently of the cytokines used in the shoot multiplication phase. The results showed that there was no significant difference between BAP and mT in the rooting process, while a higher percentage of successfully acclimatized plants was in plants formed on medium with mT.

**Keywords**: caper, *capparis*, *in vitro*, micropropagation, growth regulator

# 1. UVOD

Kapar (*Capparis orientalis* Veill.) je biljka koja ima dugu povijest i ljudi od davnina poznaju njena ljekovita i aromatična svojstva koja koriste u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Poznata je kao vrsta koja raste u mediteranskim zemljama, odakle i potječe. Prema Güleryüz i sur. (2009) kapari trenutno prirodno rastu u Španjolskoj, Francuskoj, Maroku, Monaku, Italiji, Malti, obalnim dijelovima Hrvatske, Makedonije, Albanije, Grčke, Tunisa, Alžira, Afrike, dijelovima J. Azije, Himalaje, Tihog Oceana i nekim dijelovima Australije. U našim krajevima raste samoniklo, duž Jadranske obale, na otocima i otočićima srednje i južne Dalmacije u pukotinama stijena, starih kuća i gradskih zidina.

Prirodno je samonikla vrsta ali sve više se prepoznaje važnost komercijalnog uzgoja zbog sve većeg značaja u prehrani. Njezini cvjetni pupoljci koji se konzumiraju ukiseljeni u octu ili konzervirani u granulama soli (Sher i Alyemeni, 2010). Uzgoj kapara još uvijek je u začecima, no postoji veliki potencijal zbog toga što ima vrlo male zahtjeve u uzgoju, tolerantna je na nepovoljne uvjete te zbog svog snažnog i dubokog korijena kojeg razvija može doprinijeti sprječavanju erozije tla (Carra i sur., 2012).

Ovu biljku moguće je razmnožavati vegetativno i generativno ali kod oba načina postoje neki nedostaci. Kod generativnog načina razmnožavanja problem stoji u niskom postotku klijavosti sjemena uzrokovanom zbog dormantnosti (Carra i sur., 2011). Dormatnost može biti posljedica tvrde sjemene ovojnice koja sprječava ulazak vode u sjemenku, prisutnost inhibitora klijanja ili lučenje sluzi nakon vlaženja sjemenke što onemogućava pristup kisika embriju. Nadalje, kod vegetativng načina razmnožavanja, kod kojeg je prednost to što se izbjegava velika varijabilnost, a zadržava stabilnost svojstava kvalitete, postoji problem otežanog zakorjenjivanja ovo vrste.

Uz ove spoznaje u današnje vrijeme sve više raste interes za uzgoj u *in vitro* uvjetima gdje se razmnožavanje provodi uvođenjem matične biljke u kulturu. Na taj način se u kontroliranim i aseptičkim uvjetima mogu proizvesti vrlo kvalitetne, uniformne biljke. U odnosu na klasično vegetativno razmnožavanje reznicama, *in vivo* način razmnožavanja ima puno više prednosti. Hranidbeni medij na koji se postavljaju eksplantati za daljnje umnažanje i zakorijenjivanje biljke pripravlja se po točno određenom protokolu, sa svim potrebnim hranjivima za rast i razvoj određene biljne vrste. Cijeli proces je vremenski puno brži i potrebno je puno manje prostora za ramnožavanje matičnih biljaka u odnosu na *in vivo* proces. Potrebno je znatno manje sredstva koja se inače troše (za grijanje staklenika, prostora i sl.) u *in vivo* procesu razmnožavanja. U komorama rasta reguliraju se vanjski čimbenici tijekom razvoja biljke poput optimizacije svjetlosti, topline i vlage zraka (Marković i Preiner, 2011).

Nadalje, primjena egzogenih biljnih hormona od velikog je značaja za diobu, diferencijaciju i produženi rast stanica. Izbor citokinina za upotrebu u kulturi tkiva određen je njegovom

kumulativnom učinkovitošću u induciranju prihvatljive brzine razmnožavanja izbojaka, normalnih izbojaka i korijena i eventualne sposobnosti biljaka da se lako aklimatiziraju (Bairu i sur., 2007).
Kroz sve navedeno, uz optimalne uvjete rasta, mogu se proizvesti biljke koje su vrlo visoke kvalitete, uniformne i bez virusa i bolesti što je poželjno za daljni komercijalni uzgoj neke vrste.

## 1.1. Cilj i hipoteza istraživanja

Cilj istraživanja je procijeniti utjecaj različitih koncentracija (0.5, 1, 2 i 4 mg/l) citokinina (6-benzilaminopurin, BAP i meta-Topolina, mT) na multiplikaciju te njihov naknadni učinak (carry over efekt) na zakorjenjivanje i aklimatizaciju biljke kapar (*Capparis orientalis* Veill).

**Hipoteze:**

1. Biljka kapar prirodno teško zakorjenjuje

2. Za razliku od 6-benzilaminopurina (BAP), citokinin meta-Topolin (mT) brzo translocira u biljna tkiva bez lokaliziranog nakupljanja što rezultira manjim naknadnim učinkom (carry over efektom) na zakorjenjivanje

3. Naknadni učinak citokinina (carry over efekt) na zakorjenjivanje u *in vitro* uvjetima prenosi se i vidljiv je i u fazi aklimatizacije, u *in vivo* uvjetima

# 2. PREGLED LITERATURE

## 2.1. Taksonomija i rasprostranjenost kapara

Biljka kapar (*lat. Capparis spinosa* L.) je samonikla biljna vrsta koja pripada porodici kaparovki (lat. *Capparaceae*). Ova porodica prema Güleryüz i sur. (2009) broji oko 700 vrsta, a glavne kultivirane vrste su *Capparis spinosa* L. i *Capparis ovata* Desf.

Vrsta *Capparis spinosa* ima tri podvrste:
• *Capparis spinosa* var. *inermis* Turra,
• *Capparis spinosa* var. *spinosa* Zoh. i
• *Capparis spinosa* var. *aegyptia* (Lam.) Boiss.

Vrsta *Capparis ovata* Desf. ima tri podvrste:
• C*apparis ovata* var. *palestina* Zoh.,
• *Capparis ovata* var. *canescens* Heywood i
• *Capparis ovata* var. *herbacea* Willd.

Prema Riviera i sur. (2006) *C. orientalis* je vjerojatno jedan od roditelja, zajedno s *C. sicula* hibridu *Capparis spinosa* L. Capparis spinosa L. biljka je iz suhih predjela zapadne ili središnje Azije i ima široko područje rasta, a uzgaja se posebno u Mediteranskom bazenu (Panico i sur., 2005). Prema Güleryüz i sur. (2009) kapari trenutno prirodno rastu u Španjolskoj, Francuskoj, Maroku, Monaku, Italiji, Malti, obalnim dijelovima Hrvatske, Makedonije, Albanije, Grčke, Tunisa, Alžira, Afrike, dijelovima J. Azije, Himalaje, Tihog Oceana i nekim dijelovima Australije.

Ova vrsta ima dugu povijest i ljudi ju poznaju i koriste njena ljekovita i aromatična svojstva još od davnina. Sjeme je zabilježeno na groblju Yanghai u Kini. U staroj egipatskoj civilizaciji sjeme je također pronađeno u faraonskim grobnicama. Dioscorides je kapare spomenuo kao tržišni proizvod starih Grka, a spominje ih i rimski učenjak Plinije Stariji (Güleryüz i sur., 2009).

Danas se kapar intezivno uzgaja, konzumira i njime se trguje te predstavlja veliku vrijednost u Italiji, Francuskoj i Španjolskoj. Kapar se u Italiji u posljednja tri desetljeća uzgaja uglavnom na otoku Salina i Pantelleria gdje je postao važna gospodarska kultura te je zbog toga i dobio EU oznaku „zaštićena oznaka zemljopisnog podrijetla“ (ZOZP) (Carra i sur., 2012).

Slika 2.1. Kapar na kamenom zidu
(Izvor: Histria Aromatica)

Slika 2.2. Kapar na zidu kamene kuće
(Izvor: Kapar)

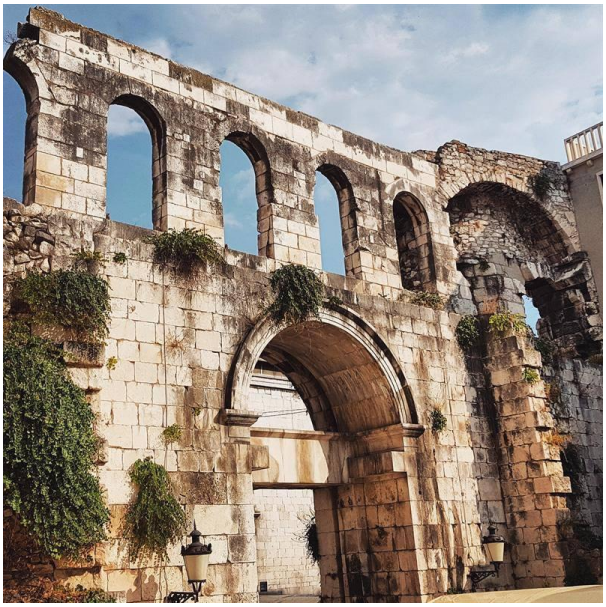
### 2.1.1. Rasprostranjenost u Hrvatskoj

U našim krajevima ova biljka raste samoniklo, duž Jadranske obale, na otocima i otočićima srednje i južne Dalmacije. U Hrvatskoj nema značajnijeg uzgoja kapara u komercijalne svrhe. Kuštrak (2014.) navodi da je kapar u nas rasprostranjen u Hrvatskom primorju i Dalmaciji, kao jedina biljna vrsta iz pretežno tropske i suptropske porodice Capparidaceae. Većinom ju možemo vidjeti u pukotinama stijena, starih kuća i gradskih zidina (Slika 2.1. i Slika 2.2.). Duž naše obale možemo reći da je kapar dosta prisutan na uzobalju južnog Jadrana i pučinskim otocima sve do Palagruže i Sveca (Slika 2.3.). Na srednjem Jadranu ga također nalazimo sve do Zadra i Silbe iznad koje je rijedak, izuzev starog dijela grada Raba gdje ga ima, kao i u

Dubrovniku i Komiži (Kovačević, 2014). U svom djelu Ribanje i ribarsko prigovaranje spominje ga i hvarski pjesnik Petar Hektorović (1487. – 1582.) čime se potvrđuje njegova prisutnost na otoku Hvaru od davnina. Dvor Jurja Dalmatinca u Šibeniku, Hanibala Lucića na Hvaru, tvrđave Hvar, Vis, Vransko jezero, povijesne zidine Dioklecijanove palače (Slika 2.4.), Dubrovnika i Stona, benediktinski samostani na Mljetu i u Tkonu samo su neka od mnoštvo mjesta koje Kovačević (2014) navodi kao staništa kapara na našoj obali. U Hrvatskoj su raširene vrste *C. orientalis* Veill. i *C. spinosa* L. (Kereša i sur., 2019).

Slika 2.3. Kapar na otoku Palagruži

(Izvor: https://morski.hr/2020/06/23/kapari-na-palagruzi/ )



Slika 2.4. Kapar na zidinama Dioklecijanove Palače (Izvor: Dioklecijanova palača)

## 2.2. Morfološke karakteristike kapara

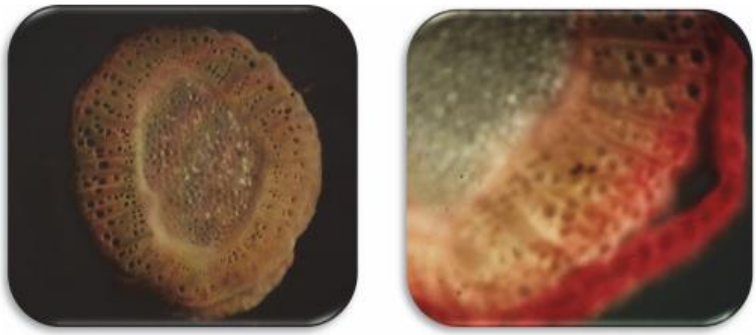
*C. spinosa* L. var. *spinosa* je grmolika trajnica. Može narasti do visine od oko 1 metar. Sasvim prizemno deblo (tapat) je drvenasto, a koje kod najstarijih primjeraka doseže 50-80 cm promjera, iz čijih bazalnih pupova se granaju brojni jednogodišnji izboji, prutovi (Kovačević, 2005). Na visećim granama razvijaju se zeleni, izmjenični, cjeloviti okruglasti listovi, koji pri dnu peteljke imaju obično po dva trna (Kuštrak, 2014). Ovaj grm može rasti uspravno, polegnuto na tlu ili u visećem položaju kada raste na zidovima.

Cvjetovi su samostalni u pazušcima vršnih listova (Slika 2.5.), na peteljkama 3-8 cm duljine. Imaju 4 lapa ružičasto-purpurne boje 2-3 cm duljine i 4 vrlo nježne, bijele latice s ružičastim žilama. Cvjetovi su hermafroditni. Prašnika ima mnogo, filamenti su na vrhu ljubičasti (Kovačević, 2005). Plod je boba (Slika 2.6.). Tamnocrveni plod je i do 5 cm dug i 3 cm širok s mnogo sjemenaka. Kapari su još zatvoreni, veći ili manji cvjetni pupoljci, jajasta ili okruglog oblika, s četiri brida, zelene boje, s ostatkom peteljke ili bez njezina ostatka. (Kuštrak, 2014).

Slika 2.5. Cvijet kapara
(Izvor: https://explorecroatia.eu/blog/dragulj-iz-kamena-tajanstvena-kapara/ )

Slika 2.6. Plod kapara, cijelovita boba (lijevo) i poprečno prerezan (desno)
(Izvor: http://www.floraofqatar.com/ )

El. amri i sur. (2019) navode kako je provodni sustav u stabljikama (ksilem) jako dobro razvijen (Slika 2.7.) što omogućuje održavanje zadovoljavajuće ravnoteže vode tijekom sušnih razdoblja. Također, Gan i sur. (2013) u svojem istraživanju navode da su vaskularni snop (provodno tkivo) i ksilem bili dobro razvijeni kod divlje biljke kapara u odnosu na presadnice razvijene *in vitro*, što sugerira povećani transport vode u biljkama u uvjetima suše. Iz tog razloga kapar može rasti i opstati u izuzetno sušnim uvjetima. Pored toga, utvrđeno je da ova biljka posjeduje sposobnost prilagodbe na ekstremne uvjete okoline poput suše u vidu promjene strukture lišća, stabljike i korijena. Ksilem i fibro-vaskularni sustav povećavaju se, a tranzitno područje između korijena i stabljike povećava kako bi se povećala apsorpcija i sposobnost skladištenja vode (Gan i sur., 2013).



Slika 2.7. Anatomska građa stabljike *Capparis spinosa* L.
(Izvor: El amri i sur., 2019)

Korjenov sustav djelomično je odrvenio, karakteriziran je mesnatim korijenjem, koje prodire duboko (i do 10 m). U nekim slučajevima može imati bodlje, nastale od palistića (Kovačević, 2005.), što je razlikovno obilježje ove vrste. Stariji primjerci ove biljke imaju razvijen snažan korjenov sustav koji prodire duboko u tlo što pomaže u smanjenju erozije tla. Carra i sur. (2012) navode kako je korijen ove mediteranske biljke koristan za stabilizaciju tla jer se smatra da zrele biljke kapara, koje razvijaju velike ekstenzivne korjenove sustave koji duboko prodiru u tlo, smanjuju eroziju tla u stjenovitom i strmom krajoliku i čuvaju zalihe vode u tlu.

## 2.3. Biološka svojstva i ekološki zahtjevi

Kao samonikla biljka, kserofit i heliofit, kapar je vrlo raširen u Mediteranskom bazenu zbog tolerancije na klimatska ograničenja u aridnim i semiaridnim zonama, kao i na ekstremne temperature (El amri i sur. 2019). Raste na stjenovitom terenu, u pukotinama te može podnijeti različite tipove tla. Na različitim lokacijama Himalaje, *C. spinosa* podnosi i muljevitu glinu i pjeskovita, stjenovita ili šljunkovita tla s manje od 1% organske tvari (Mohammad i sur., 2012). Kapar voli lagana, rastresita do srednje teška tla bogata skeletom. Vrsta *C. ovata* Desf. podnosi i nešto teža tla od C. spinosa L. Podnosi i viši sadržaj aktivnog vapna. Optimalan pH je od 7,5

do 8, a rezistentan je i na posolicu i slana tla (Kovačević, 2005). Ova biljka je tolerantna na sol koju dobro podnosi duž morske obale na kojoj uspješno raste (Soyler i Khawar, 2007).

Također, ovaj grm ima visoki omjer korijena i izboja te prisutnost mikorize što služi za maksimaliziranje unosa minerala iz tla. Iz rizosfere grma kapara izolirani su različiti sojevi bakterija koji fiksiraju dušik i na taj način se održava visoka razina tog elementa (Mohammad i sur., 2012). U usporedbi s drugim pustinjskim biljkama, kapar ima visoku učinkovitost korištenja vode (eng. water use efficiency, WUE) i izvanrednu sposobnost pronalaska i upijanja vode iz svog okoliša (posebno u dubini tla) zahvaljujući opsežnom korjenovom sustavu i vrlo dobrom odnosu korijen-stabljika (Chedraoui i sur., 2017). Zbog toga je ova biljka pogodna za očuvanje vode u tlu i reguliranje mikroklime jer takvi grmovi svojim vegetativnim, nadzemnim dijelom ograničavaju visoke temperature tla na način da ga pokrivaju i time štite od direktne sunčeve svjetlosti.

Suhi topli zrak i intenzivna sunčeva svjetlost preferirano su okruženje za biljku kapar. Ove biljke su produktivne u zonama 200-600 mm padalina godišnje i lako preživljavaju temperature veće od 35-40°C (Güleryüz i sur., 2009). Cvjetni pupoljci kapara beru se od kraja svibnja do početka rujna, danju prije izlaska sunca, kad su relativno mali. Poslije branja pupoljci se peru, dobro ocijede, a zatim ostavljaju u sjeni da povenu. Potom se razvrstavaju prema veličini, jer je to propis tržišta (Kuštrak, 2014).

## 2.4. Razmnožavanje kapara

Biljku kapar moguće je razmnožavati generativnim i vegetativnim putem. Oba načina imaju određene nedostatke. Konvencionalni način razmnožavanja sjemenom nije poželjan za razmnožavanje biljke kapar zbog dva razloga: postoji nizak postotak klijavosti sjemena zbog dormantnosti sjemena i unakrsno oprašivanje biljke što rezultira visokim stupnjem heterozigotnosti u sjemenu (Musallam i sur., 2011). Kako bi se postigao veći postotak klijavosti, na sjemenu kapara potrebno je provesti hladnu stratifikaciju. Također, tretiranjem sjemena biljnim regulatorima rasta može se utjecati na razvoj korijena i klijanje. Güleryüz i sur. (2009) navode da je kod primjene biljnih regulatora rasta, posebno giberelina, zabilježena povećana klijavosti sjemena za više od dvostruko. Carra i sur. (2012) navode da biljke kapara dobivene sjemenom pokazuju visoku varijabilnost gena i iako on može biti koristan u smislu uvođenja novih genetiskih varijanti, to također može dovesti do gubitka rijetkih genotipova.

S druge strane, pogodno je koristiti reznice tj. vegetativni način razmnožavanja jer se na taj način izbjegava velika varijabilnost u pogledu proizvodnje i kvalitete te se zadržavaju genotipovi od interesa, a moguće je dobiti veliki broj novih jedinki dobre kvalitete i ujednačenosti. Prema Güleryüz i sur. (2009) najbolje vrijeme za prikupljanje reznica je veljača, ožujak ili travanj na Mediteranskom području. Reznice stabljike mogu se pripremiti od bazalnih dijelova, promjera većeg od 1 cm i duljine od oko 8 cm sa 6-10 pupova. No, prilikom

vegetativnog razmnožavanja reznicama, kapar teško zakorjenjuje što predstavlja problem za veću proizvodnju ove biljke u komercijalne svrhe. Musallam i sur. (2011) navode da konvecionalna metoda vegetativnim razmnožavanjem reznicama ima nisku sposobnost zakorjenjivanja (55%) i nizak stupanj uspješnosti (30%). Uočena je velika varijabilnost tijekom zakorjenjivanja stoga se vegetativni način razmnožavanja smatra neprikladnim za brzo razmnožavanje klonova ili uspostavljanje usjeva (Carra i sur., 2012). No, Güleryüz i sur. (2009) navode da upotreba indol-3-maslačne kiseline (IBA) može biti korisna za povećanje ukorjenjivanja reznica.

## 2.5. Kemijski sastav i primjena

Kapar je biljka koja je još od davnina poznata po svojim ljekovitim i aromatičnim svojstvima. Stoga je svoju primjenu pronašla ne samo u prehrambenoj industriji, već i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji kao ljekovita biljka i afrodizijak. Uzgoj kapara može biti od velike ekonomske vrijednosti s obzirom na mnoge bioaktivne komponente koje sadrži u raznim dijelovima biljke.

Cvjetni pupoljci bogati su vitaminom C. U svježim pupoljcima ima 115-170 mg% vitamina C, a u plodovima oko 130 mg%. U pupoljcima ima još glikozida rutina i nešto metil-goruščina ulja (Grlić, 1986). Kapari sadrže glukozinolate; u cvjetnim pupoljcima, ali i u listovima i sjemenu glavna je sastavnica glukokaparin, koji djelovanjem fermenta mirozinaze prelazi u metilgoruščino ulje. Od drugih spojeva kapari sadrže fenolkarbonske kiseline, flavonoide (oko 5% rutina), saponine i pektine. Svi ti spojevi, kako navodi Kuštrak (2014) utječu na miris i okus kapara kao začina.

Tablica 2.1. Hranjiva vrijednost plodova kapara (na 100 g)

| Sadržaj | Iznos na 100 g |
|---|---|
| Energija | 20 kcal |
| Ugljikohidrati | 5 g |
| Masti | 0,9 g |
| Vlakna | 3 g |
| Šećer | 0,4 g |
| Natrij | 2960 mg |
| Željezo | 1,7 mg |
| Bjelančevine | 2 g |
| Vitamin C | 4 mg |

(Izvor: Sher i Alyemeni, 2010)

Hranidbena vrijednost ploda kapara prema Sher i Alyemeni (2010) prikazana je u Tablici 2.1. iz koje je vidljivo da je kalorična vrijednost ploda niska, zbog niskog sadržaja ugljikohidrata i masti.

Uzgoj ove vrste može biti financijski vrlo isplativ s obzirom na njenu otpornost na različite stresove. S obzirom na bioaktivne tvari koje sadrži i čime postiže visoku hranjivu vrijednost, pronalazi svoju primjenu u kozmetičkoj industriji i proizvodnji lijekova, a također i veliki interes postiže kao prehrambeni proizvod.

Chedraoui i sur. (2017) navode kako su Iranci koristili korijen, plod i koru ove vrste za pripremu diuretika i tonika protiv malarije i bolesti zglobova. U Pakistanu se lišće *C. spinose* koristi kao analgetik, protiv reumatizma i u liječenju hemeroida. U Indiji su cvjetni pupoljci i korijen poznati u liječenju vručice, dok se lišće koristi kao protuiritativno sredstvo i kao oblog kod oteklina. Također, navodi se uspješan učinak u liječenju astme, kašlja, zubobolje i različitih upala.

### 2.5.1. Upotreba u kulinarstvu

U kulinarstvu, kao začin, upotrebljavaju se neotvoreni cvjetni pupoljci. U mnogim zemljama poznati su pod nazivom „kapari“.

Grlić (2005) navodi da se oni ulažu u vinski ocat svježi (ne treba ih ostaviti da se osuše). Stajanjem u octu razvijaju karakterističnu aromu, koja potječe od kaprinske kiseline. Također, Grlić (2005) navodi kako ponegdje pupoljke ulažu i u slanu vodu ili ulje. Konzervirati se mogu i u 6%-tnoj otopini soli uz dodatak 1%-tne octene kiseline. Maceracija traje tri mjeseca prije nego što začin dospije na tržište i u prodaju (Kuštrak, 2014).
Prepoznatljivi po oštrom pikantnom okusu i slanoći, pronašli su primjenu kao začin i dodatak jelima poput raznih umaka s tjesteninom, pizze, ribe, mesa i salata. U kuhana jela dodaju se na kraju kuhanja kako bi se očuvale sve arome. Često se njihov okus uspoređuje s okusom senfa i crnog papra. Kapari se beru svakodnevno, a kategoriziraju i prodaju se s obzirom na veličinu. Sitniji, tvrđi i okrugliji cvjetni pupoljci (veličine graška) najcjenjeniji su i imaju najvišu kvalitetu.

Budući da kapari rastu samo u području Sredozemlja, često ih u Njemačkoj i zemljama srednje Europe patvore i nastoje nadomjestiti pupoljcima drugog bilja. Kao patvorina ili zamjena za kapare služe pupoljci dragoljuba, nevena, tratinčice, maslačka i dr. (Kuštrak, 2014).

## 2.6. Kultura tkiva

Kultura biljnog tkiva odnosi se na uzgoj i umnožavanje izoliranih stanica, komadića tkiva ili vrlo sitnih organa na definiranim čvrstim ili tekućim podlogama u aseptičnom i kontroliranom okruženju. Ovaj način razmnožavanja biljnog materijala često možemo pronaći pod nazivom „mikrorazmnožavanje“ jer su biljni organi ili cijele biljke u minijaturnim verzijama. Tehnologija kulture biljnog tkiva široko se koristi za umnožavanje biljaka (IAEA, 2004). Ima primjenu u mnogim disciplinama (genetici, biokemiji, fiziologiji i molekularnoj biologiji) te je pogodna metoda za tržišnu proizvodnju zato što se na malom prostoru i u relativno kratkom roku može proizvesti veliki broj sadnica od samo jedne biljke. Serije biljaka razmnožene ovom metodom istovjetne su po razvoju, rastu i genetičkom potencijalu vrste. Bez sumnje, to je proces kloniranja, jer sve proizvedene biljke predstavljaju matične kopije razmnoženog majčinskog uzorka (Pintarić, 2008).

Tehnika kulture tkiva zasniva se na konceptu „*stanične titopotentnosti*“ odnosno metodama regeneracije kompletne nove biljke iz jedne diferencirane stanice, malih komadića tkiva (eksplantati) ili organa roditeljske biljke. To je moguće zato što svaka stanica nosi kompletni genetički materijal i nakon umnažanja može se diferencirati u korijen, izdanak ili embrionalnu strukturu.

*In vitro* načinom razmnožavanja u kulturi tkiva, uz dobivanje uniformnog sadnog materijala, moguća je i elimininacija virusa iz zaraženih tkiva biljke i održavanje ugroženih biljnih izvora. Glavna prednost tehnologije kulture tkiva je proizvodnja visokokvalitetnog i ujednačenog sadnog materijala koji se može umnožavati tijekom cijele godine u uvjetima bez bolesti bilo gdje, bez obzira na godišnje doba i vrijeme (IAEA, 2004).

Ovaj način razmnožavanja biljaka u *in vitr*o uvjetima ima mnogo prednosti u odnosu na klasično vegetativno razmnožavanje i to zbog sljedećih činjenica:

1. Razmnožavanje *in vitro* mnogo je brže od razmnožavanja *in vivo*

2. Moguće je razmnožavati i one biljne vrste koje u uvjetima *in vivo* nije moguće

3. Mikroklonirane biljke često rastu bolje i snažnije od biljaka kloniranih *in vivo*

4. U kulturi *in vitro* razmnožavaju se samo zdrave biljke

5. Može se uštedjeti znatna sredstva koja se inače troše (za grijanje staklenika, prostora i dr.). Prostor potreban za podizanje i razmnožavanje matičnih biljaka znatno se smanjuje upotrebom kulture *in vitro*

6. Zahvaljujući optimalnim uvjetima (hranidbena podloga i fizički faktori) omogućeno je precizno vremensko planiranje proizvodnje presadnica, čime se poništava sezonski utjecaj i omogućava proizvodnja kroz čitavu godinu (Jelaska, 1994).

Uobičajeni rad odvija se kroz sljedeće faze mikropropagacije:
1. Prikupljanje biljnog materijala
2. Površinska sterilizacija biljnog materijala
3. Obrada biljnog materijala
4. Uspostavljanje inicijalne kulture
5. Multiplikacija izdanaka
6. Izduživanje izdanaka
7. Zakorjenjivanje izdanaka
8. Aklimatizacija

Tijekom procesa mikrorazmnožavanja eksplantate je potrebno supkultivirati i nekoliko puta. Kako navodi Jelaska (1994) supkultiviranje eksplantata potrebno je zbog sljedećih razloga:

- hranidbena podloga se istrošila
- podloga se osušila
- kultura je ispunila prostor Magenta posude ili epruvete
- materijal je potrebno dalje umnožavati
- smeđa ili crna obojenost u podlozi kao rezultat ispuštanja tvari (najčešće fenola), često toksičnih za eksplantat (osobito u tijeku prvih nekoliko tjedana)
- katkad je materijal potrebno prenijeti na podlogu izmijenjena sastava
- podloga je postala tekuća zbog sniženja pH uzrokovanog biljnim materijalom

### 2.6.1. Kapari u kulturi tkiva

Komercijalni uzgoj biljke kapar može biti otežan zbog teškog zakorjenjivanja stoga se umjesto vegetativnog načina razmnožavanja reznicama, uz sve više novih istraživanja, kvalitetni sadni materijal može dobiti tehnikama razmnožavanja u kulturi tkiva tzv. mikrorazmnožavanje. Ova tehnika omogućuje visoku stopu umnožavanja genetski ujednačenog sadnog materijala. Pokazalo se da je uspostavljanje matičnih biljaka *in vitro* iz vrhova izdanaka povoljnije od nodijskih reznica (Musallam i sur., 2011).

Prilikom uvođenja biljke u kulturu u *in vitro* uvjete, prednost imaju mladi i aktivno rastući izdanci prikupljeni u proljeće kako bi se izbjegao gubitak materijala zbog kontaminacije kulture. Carra i sur. (2012) navode kako je bilo vrlo teško uvesti *in vitro* biljni materijal prikupljen krajem ljeta, dok je biljni materijal prikupljen u proljeće dao pozitivne rezultate s visokim postotkom uspješnog uspostavljanja.

Također, smatra se da su najbolji rezultati, u smislu višestruke indukcije aksilarnih izdanaka, postignuti kada su adeninski citokinini (uglavnom BAP) korišteni sami (u hranjivom mediju) ili u kombinaciji s niskim koncentracijama auksina (Carra i sur., 2012). Musallam i sur. (2011) su testirali MS medij, modificirani MS (1/2 MS) i WPM (eng. *Woody Plant medium*) u mikropropagaciji *C. spinosa*. Utvrđeno je da je WPM najbolji medij za uspostavljanje kulture tkiva kapara. Najveći broj izdanaka dobiven je na WPM mediju 14 obogaćenom s 0.8 mg/l kinetina u kombinaciji sa 0.05 mg/l indolil-3-maslačne kiseline i 0.1 mg/l giberelinske kiseline. Utvrđen je i najveći postotak zakorjenjivanja (80%) u ½ MS mediju u kombinaciji sa 5 mg/l indolil-3-octene kiseline. Zakorjenjene biljčice uspješno su aklimatizirane sa 63% preživljavanja.

Najbolji parametri razmnožavanja i učinci rasta *C. spinose* dobiveni su na mediju s 1,2 mg/l BAP-a. Pri tim koncentracijama broj izdanaka bio je (4,6-4,8), a duljina izdanaka bila je od 1,78 do 1,82 cm. Više izdanaka moglo bi se dobiti na mediju koji sadrži 2 mg/l BAP-a ali su ti izdanci u kompaktnom grmiću te se ne mogu izdužiti i ne mogu preživjeti nakon odvajanja od matičnog grmića. Manje izdanaka (4,7) formirano je s 1,2 mg/l BAP-a te je smanjenje broja izdanaka nadoknađeno povećanom duljinom pojedinog izdanka te je utvrđeno da su ti izdanci pogodni za indukciju korijena (Musallam i sur., 2011).

Na 2,5 mg/l IBA postignut je najveći postotak zakorjenjivanja (50%), duljina korijena (4,3 mm) i broj korijena (1,8) s dobrom duljinom izdanka (3,16 cm) i malo kalusa. Međutim, Carra i sur. (2011) dobili su najbolje rezultate (100% zakorjenjenih eksplantata) kada su eksplantati umočeni u otopinu s 10 mg/l IBA-e u trajanju od 10 minuta i kontinuirano održavani u mediju bez regulatora rasta. Nove biljke bile su snažne, kvalitetne i imale su fenotipske osobine slične matičnim biljkama.

## 2.7. Biljni regulatori rasta

Biljni regulatori rasta (fitohormoni) su organski spojevi koje biljka sintetizira i pomoću njih se koordiniraju svi procesi u biljci. Budući da kao i kod ljudi i životinja, biljni hormoni prvenstveno utječu na rast i razvoj, nazivamo ih još i regulatorima rasta. Uz prirodne biljne hormone postoje i oni dobiveni sintetskim putem. U kulturi tkiva oni čine vrlo bitne komponente koje određuju razvojni put biljnih stanica. Biljni hormoni se translociraju unutar biljke i utječu na rast i diferencijaciju tkiva i organa s kojima dođu u dodir. Djeluju na diobe, produžni rast i diferencijaciju stanica. Dijele se u pet grupa: auksini, citokinini, giberelini, etilen i apscizinska kiselina (Pevalek-Kozlina 2003). Od toga prve tri skupine (auksini, citokinini i giberelini) stimuliraju procese, a preostale dvije (etilen i apscizinska kiselina) inhibiraju pojedine procese u biljkama. U ovom radu praćen je rast biljake kapar i uspješnost zakorjenjivanja na hranidbenim podlogama s dodatkom auksina (IBA) i različitih koncentracija citokinina (BAP, mT).

Odgovor biljke na djelovanje biljnih hormona ovisi o njihovim koncentracijama kao i o vrsti i razvojnom stadiju biljnog tkiva ili organa na koji djeluju. Hormoni citokinini i auksini pomiješani u određenim omjerima mogu stimulirati diferencijaciju biljnih organa iz neorganiziranih staničnih linija (kalusa) (Marković i Preiner, 2011). Za regeneraciju i rast stabljike ili korijena biljke bitan je koncentracijski omjer auksina i citokinina. Ukoliko nedostaje jedan od ova dva hormona neće doći do povećanja i rasta biljnog organizma (Pevalek-Kozlina 2003). Tako npr. niska koncentracija auksina stimulira rast korijena, a visoka koncentracija ga inhibira. Ili jednaka koncentracija auksina stimulira rast izdanka, ali inhibira rast korijena (Škvorc i sur., 2013). Zato su vrsta i koncentracija regulatora rasta u mediju za uspostavljanje kulture i u kasnijoj fazi za zakorjenjivanje od velike važnosti za uspješno proveden proces mikrorazmnožavanja.

Citokinini su otkriveni tijekom 1950-ih zbog svojih sposobnost induciranja diobe biljnih stanica. Ubrzo nakon otkrića, Skoog i Miller postavili su hipotezu o omjeru auksin-citokininu u morfogenezi biljaka. Hipoteza je predviđala da citokinini, zajedno s auksinima, imaju bitnu ulogu u morfogenezi biljaka koja ima veliki utjecaj na nastanak korijenja i izdanaka i njihov relativni rast (Werner i sur., 2001). Hormoni mogu djelovati na aktivnost pojedinih gena i postojećih enzima te mijenjati svojstva plazmatskih membrana. Svako od tih djelovanja može uzrokovati promjene u metabolizmu i razvoju stanice. Treba istaknuti da reakcija na pojedini biljni hormon ne ovisi toliko o njegovoj apsolutnoj koncentraciji koliko o odnosu koncentracija svih prisutnih hormona (Škvorc i sur., 2013).

Biljni hormoni pronađeni su kao rezultat istraživanja tvari koje stimuliraju diobu stanica (citokinezu). Nakon njihova otkrića utvrđeno je da su uključeni u regulaciju mnogih fizioloških i razvojnih procesa, poput senescencije, mobilizacije hranjiva, apikalne dominacije, razvoja cvata, klijanja sjemena i prestanka mirovanja pupa. Također su uključeni u mnoge reakcije biljke na svjetlost, poput diferencijacije kloroplasta, rasta kotiledona i lista i sl. (Lazarević i Poljak, 2019). Souza i sur. (2019) ističu kako još uvijek postoje poteškoće u mikropropagaciji biljaka, poput niske stope razmnožavanja, morfoloških abnormalnosti i neadekvatnog zakorjenjivanja. Navedeni problemi mogu se svesti na minimum primjenom odgovarajuće vrste i koncentracije regulatora rasta, posebno citokinina, jer su povezani s diobom stanica.

## 2.8. Citokinini

Citokinini su skupina prirodnih $N^6$-supstituiranih adeninskih spojeva koji su neophodni u regulaciji mnogih fizioloških procesa u biljkama. Oni reguliraju vršnu dominaciju u izdanku, grananje, starenje listova, rast korijenja i proizvodnju klorofila (Mok, 1994). Danas, uz veliki broj već poznatih prirodnih citokinina, kao što je prethodno navedeno, proizvode se i sintetski spojevi koji pokazuju citokininsku aktivnost. Gotovo svi sintetski citokinini su $N^6$-supstituirani derivati adenina.

Smatralo se da su citokinini sintetizirani u korijenu i transportirani u izdanke, no novije studije pokazuju da se citokinini stvaraju u cijeloj biljci, uključujući u zračnim tkivima (Kieber i Schaller, 2014). Prema Lazarević i sur. (2019) glavno mjesto sinteze citokinina je korjenov vegetacijski vrh te se citokinini nastali u korijenu ksilemom transportiraju u nadzemne dijelove. Međutim, korijen nije jedino mjesto sinteze citokinina. Primjerice, citokinini se mogu sintetizirati u mladim embrijima sjemenki, kao i mladom lišću i mladim plodovima.

Oni su neophodni u tehnikama mikropropagacije biljaka jer potiču diobu stanica i osiguravaju normalan i proporcionalan razvoj biljnih organa. Mikropropagacija praćena primjenom citokinina u medijima za kulturu tkiva brza je biotehnološka metoda prihvaćena u komercijalnoj proizvodnji važnih biljaka kao što su banana, jabuka, ruža, jagoda, krumpir, kao i za očuvanje ugroženih vrsta poput *Harpagophytum prucubens* ili *Aloe polyphylla* (Plíhal i sur.,2013).

Pokazalo se da primjena egzogenih citokinina na neke organe kojima normalno nedostaje ovaj hormon potiče diobu stanica, a citokinini su povezani sa svim fazama staničnog ciklusa (Kieber i Schaller, 2014). Plíhal i sur. (2013) navode kako prirodni citokinini, kao i većina njihovih sintetskih derivata, pokazuju negativne učinke na rast i razvoj korijena. Promjene u morfologiji, prvenstveno povezane s inhibicijom stanične diobe u meristematskoj zoni, očituju se kao zadebljanje i skraćivanje primarnog korijena i otežano bočno grananje korijena.

### 2.8.1. Meta-topolin i 6-benzilaminopurin

Meta-topolin (mT) i 6-benzilaminopurin (BAP) sintetski su citokinini koji se koriste u procesu mikropropagacije. Kao egzogeni citokinini dodaju se u hranidbeni medij te ih na taj način biljka usvaja. Trenutno je 6-benzilaminopurin (BAP) najčešće korišten citokinin u industriji mikropropagacije zbog svoje učinkovitosti i pristupačnost, no ima i neke nedostatke. (Bairu i sur., 2013). Nekoliko izvora (Souza, 2019; Bairu i sur., 2007; Aremu i sur., 2012) navodi nekoliko morfofizioloških poremećaja poput hiperhidričnosti koja se pripisuje upotrebi ovog regulatora rasta. To je poremećaj kod kojeg dolazi do abnormalnog nakupljanja vode unutar stanica ili tkiva biljke, a posljedica toga je proziran izgled biljke. Souza i sur. (2019) u svom istraživanju navode pojavu veće učestalosti hiperhidričnosti u izdancima na mediju s BAP-om za razliku od medija s mT-om gdje su izdanci pokazali uniformnost i dobar vigor.

Benzil-adenin (BA) je npr. u nekim biotestovima aktivniji čak i od najjačeg prirodnog citokinina, zeatina (Pevalek-Kozlina, B., 2003). Werbrouck i sur. (Bairu, 2007) navode da je u mikropropagiranom *Spathiphylum floribundumu* BAP akumuliran u podnožju biljke. Smanjena duljina izbojaka *O. stricta* može biti povezana s toksičnim učinkom BAP-a na biljke, uslijed nakupljanja i sporog otpuštanja metabolita u druge dijelove biljke što potom inhibira rast i ukorjenjivanje. Postoji mogućnost da je to povezano s povećanjem razine stabilnog metabolita [9G]BAP, čija akumulacija može uzrokovati inhibiciju rasta korijena i dovodi do problema u aklimatizaciji biljaka (Souza, 2019). Werbrouck i sur. (1995) navode da

nakupljanje [9G]BAP derivata u bazalnom dijelu biljke može rezultirati sporim oslobađanjem BAP-a tijekom aklimatizacije što uzrokuje različite probleme poput heterogenosti u rastu i inhibiciju zakorjenjivanja. Citokinini poput benzilaminopurina (BAP) smanjuju dominaciju apikalnog meristema i potiču stvaranja aksilarnih i apikalnih izdanaka (Jafari i sur., 2011). Pruski i sur. (1990) koristili su BAP (8,88-13,3 μM) za uspješnu masovnu proizvodnju izdanaka i za naknadno zakorjenjivanje *Amelanchier alnifoila* L. (Bošnjak Mihovilović i sur., 2020).

Koncentracija BAP-a od 0,5 do 1,0 mg/l je optimalna za multiplikaciju velikog broja različitih dikotiledonih biljaka, jer podloga za multiplikaciju izdanaka treba omogućavati nesmetani rast i umnožavanje eksplantanta, a da istovremeno ne izaziva obilnije kalusiranje (Pintarić, 2008). BAP je jedna od komponenta koja u hranjivom mediju stimulira sintezu betacijanina, a betacijanini smanjuju akumulaciju reaktivnih oblika kisika (eng. ROS) i štite tkiva i stanice od štete koja bi nastala kao posljedica oksidativnog stresa (Souza, 2019).

Otkriće nove skupine aromatičnih citokinina postaje alternativa u upotrebi BAP-a u cilju smanjenja fizioloških poremećaja u mikropropagiranim biljkama.

Strnad i sur. (1997) izolirali su N6-(meta-hidroksibenzil) adenin, aromatični citokinin visoke aktivnosti, iz listova topole (*Populus* x *canadensis* Moench, cv. *robusta*) i predložili trivijalni naziv ‘meta-Topolin’ (mT). Superiornost mT-a proizlazi iz činjenice da se on brzo translocira u biljna tkiva čime se sprječava lokalizirano nakupljanje, a njegovi se metaboliti brzo razgrađuju tijekom aklimatizacije (Mutui i sur., 2012). To je jedan od razloga zbog kojeg mnogi izvori navode mT kao bolji izbor citokinina tijekom procesa mikropropagacije. U nastavku teksta navedeni su i još neki primjeri.

- Werbrouck i sur. (1996) usporedili su vrste i učinke derivata BAP-a i mT-a u kulturi tkiva *S. flouribundum*. Uspoređivali su *ex vitro* učinak različitih koncentracija BAP-a i mT-a na zakorjenjivanje nakon razdoblja aklimatizacije od četiri tjedna. Njihovi rezultati otkrili su da biljke tretirane s mT-om proizvode značajno veći broj i veću duljinu korijena od onih tretiranih s BAP-om.

- Souza i sur. (2019) navode manje toksičnu prirodu mT-a u odnosu na ekvimolarne koncentracije BAP-a, što ukazuje na njegovu superiornost u stvaranju više izdanaka uz smanjenje ili potpuno odsustvo abnormalnosti.

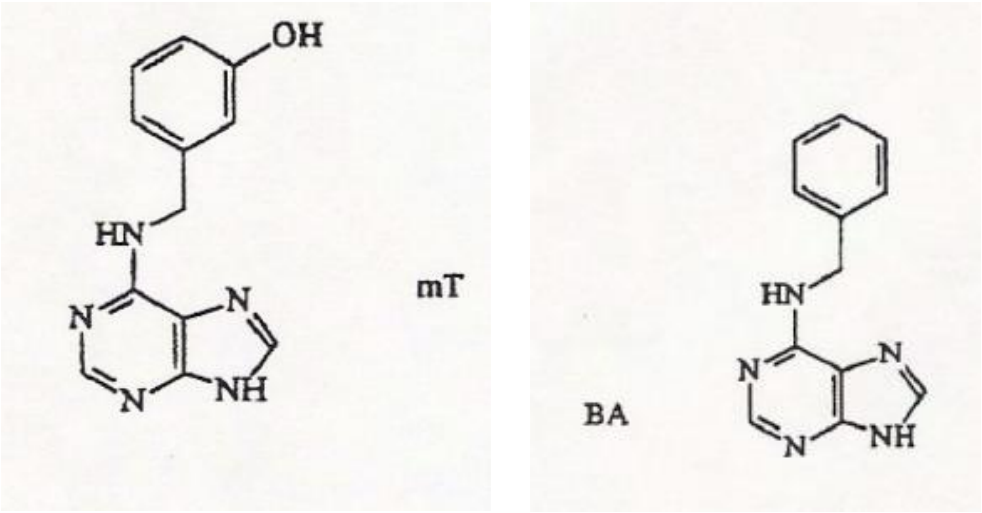
- Bairu i sur. (2007) navode kako sve više istraživanja s citokininima ukazuje na to da je mT gotovo dvostruko učinkovitiji od BAP-a u indukciji rasta izdanaka reznica te da bi mogao bit novi izvor citokinina s visokom morfogenetskom aktivnošću.

- Indeks abnormalnosti, koji je omjer abnormalnih (hiperhidrični izdanci i izdanci s nekrozom vrha izdanaka) i normalnih izdanaka u svim mT tretmanima korištenim u *in*

*vitro* razmnožavanju *Barleria greenii* L. bio je mnogo niži od onog zabilježenog kod najnižih koncentracija BAP-a (Mutui, 2012). A Bairu i sur. (2007) navode da indeks abnormalnosti mjeri toksičnost citokinina.

- Najbolji prosjek korisnih izdanaka i najbolje duljine stabljika dobivene su na podlogama obogaćenim s 2 mg/l mT-a, te je formirano približno 3-4 izdanaka dobre kvalitete po eksplantatu. Izdanci formirani na mediju s 4 mg/l BAP-a bili su manji u usporedbi s onima koji su formirani na mediju s dodatkom mT-a (Benmahioul i sur., 2012).

- BAP proizvodi izuzetno stabilne derivate, kao što je [9G] BA, za koji se smatra da inhibira zakorjenjivanje *ex vitro,* dok mT i njegovi derivati ne inhibiraju *in vitro* stvaranje i njihova je razgradnja relativno brza (Kereša i sur., 2019).




Slika 2.8. Strukturna formula mT (lijevo) i BAP (desno)
(Izvor: Werbrouck i sur., 1996.)

## 2.9. Auksini

Mjesto sinteze auksina u biljci su meristemska tkiva (mladi listovi, plodovi i vršni meristem izdanka), a može se odvijati i u odraslim listovima ili vrškovima korijena. Auksini imaju stimulirajuću ulogu u produžnom rastu stanica stabljike i koleoptila tako što omogućuju rastezanje stanične stijenke. To se događa zato što oni stimuliraju sintezu tvari potrebnih za rast stanične stijenke. Auksini su potrebni većini biljnih stanica za diobu i diferencijaciju te

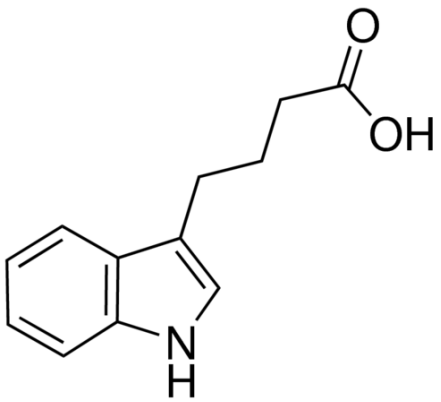
inicijaciju korijenja. U visokoj koncentraciji auksin može inhibirati morfogenezu tj. rast stanica. To se događa jer auksin inducira proizvodnju etilena koji zatomljuje produžni rast stanica. Također, djeluju na vaskularizaciju tkiva, inhibiraju rast bočnih pupova potičući apikalnu dominaciju (rast vršnog pupa), a u visokim koncentracijama stimuliraju začetak bočnog i adventivnog korijenja (Tivendale i sur. 2014).

Također, slično kao i kod citokinina, uz već dobro poznate prirodne auksine koje biljka sama sintetizira danas se proizvode i brojni sintetski auksini koji pokazuju auksinsko djelovanje, a imaju široku primjenu u agrikulturi i hortikulturi. Sintetski auksini komercijalno se koriste za pospješivanje zakorjenjivanja reznica, izazivanje partenokarpije, ubrzavanje zriobe plodova, sprječavanje otpadanja plodova prije dozrijevanja, te kao herbicidi (Pevalek-Kozlina, B., 2003).

### 2.9.1. Indol-3-maslačna kiselina

Među prvim otkrivenim auksinima je indol-3-maslačna kiselina (IBA), sintetski auksin koji je vrlo sličnog kemijskog sastava kao i najpoznatiji prirodni auksin indol-3-octena kiselina (IAA). Danas se IBA komercijalno koristi za zakorjenjivanje mnogih biljnih vrsta.
Primjena kemijskih sredstava u razmnožavanju biljaka započela je 1934. godine otkrićem auksina. Istraživanja koja su 1935. godine proveli Zimmerman i Wilcoxon pokazala su da sintetički auksin, indol-3-maslačna kiselina (IBA) pospješuje zakorjenjivanje. Stoga suvremena znanost o razmnožavanju biljaka primjenjuje IBA i njezine derivate (Drvodelić, 2012).

Pouzdano se može reći da je hormonski par BAP/IBA najčešće korišteni par hormona u mikropropagaciji, posebno kod dikotiledonih vrsta (Pintarić, 2008).




Slika 2.9. Strukturna formula indol-3-maslačne kiseline
(Izvor: Strukturna formula)

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Biljni materijal

U ovom pokusu kao biljni materijal upotrebljeni su eksplantati kapara (*Capparis orientalis* Veill.). Zdravi mladi izdanci iz divljih grmova *C. orientalis* sakupljeni su na otoku Šolti. Uniformni (vršni) izdanci izrezani su na duljinu 2-3 nodija s vršnim pupom i uvedeni u kulturi prije čega su podvrgnuti sterilizaciji.

## 3.2. Sterilizacija biljnog materijala

Prije početka samog pokusa steriliziran je biljni materijal. Sterilizacija je trajala 20 minuta s 3% Izosanom®. Nakon toga eksplantati su isprani u sterilnoj destiliranoj vodi 3 puta po 5 minuta te uvedeni u kulturu.

Utvrđeno je da bakterije, gljivice, kvasci ili alge, kada se nađu u kulturi zajedno s biljnim stanicama, ovima opasno konkuriraju za hranidbene sastojke, jer se brže razmnožavaju, a istodobno stvaraju i toksine koji brzo unište biljne stanice (Jelaska, 1994). Zato se, prema Pintarić (2008), površinska sterilizacija vrši s ciljem da se sa površine primarnog eksplantata biljke uklone mikroorganizmi, koji bi prilikom uvođenja eksplantata u kulturu *in vitro* mogli kontaminirati hranjivu podlogu. Sterilizacija treba biti dovoljno jaka, kako bi se eliminirali mikroorganizmi, ali da istovremeno ne ubije i sam primarni ekplantat.

## 3.3. Autoklaviranje i sterilizacija instrumenata

Laboratorijsko posuđe i pribor oprani su tekućom vodom i detergentom, a potom isprani destiliranom vodom. Zatim, prije upotrebe, Magenta posudice, Petrijeve zdjelice i ostali potreban pribor obloženi su aluminijskom folijom i sterilizirani u autoklavu na temperaturi od 121°C u vremenu od 25 minuta pri tlaku od 1 bar. Tim postupkom vrši se sterilizacija pod tlakom na visokoj temperaturi čime se uklanjaju nečistoće i mikroorganizmi.

Nakon toga posuđe i pribor premješteni su u sušionik. Također, prije svakog korištenja, a prilikom rada s eksplantatima, pincete i skalpeli dodatno su sterilizirani na otvorenom plamenu do usijanja. Cijeli proces inokulacije i supkultiviranja eksplantata iz jedne hranjive podloge na drugu odvija se u laminaru. To je prostor gdje se konstantno upuhuje sterilni zrak i uz prethodno sterilizirani pribor i dezinfekciju ruku alkoholom, osigurava sterilne uvjete za rad s eksplantatima.

## 3.4. Rad u laminaru i komora rasta

Svaka manipulacija s eksplantatima i hranjivom podlogom na koju su oni postavljani provođena je u laminaru. To je komora u kojoj se u horizontalnom smjeru upuhuje sterilni zrak i time osiguravaju sterilni uvjeti bez prisutnost mikroorganizama i bilo kakvih nečistoća. Prije rada u laminaru radna površina i ruke dezinficirani su sa 96% etilnim alkoholom.
Unutar laminara, na radnoj površini nalazi se plamenik s dotokom plina koji se pali s početkom rada, te se na njemu laboratorijski pribor poput pincete i skalpela učestalo steriliziraju tijekom cijelog procesa premještanja eksplantata.

Tijekom prenošenja eksplantata kapara iz jedne hranjive podloge na drugu korištene su Petrijeve zdjelice. One su poslužile kao podloga gdje se vršilo prikračivanje izdanka skalpelom na duljinu 2-3 nodija. Takvi eksplantati zatim su postavljeni na novi medij, po 5 u svaku Magenta posudicu. Magente su potom zaklopljene s pripadajućim poklopcem i dodatno izolirane tankom laboratorijskom membranom za omatanje posuda, parafilmom.
Posudice s eksplantatima postavljene su u komoru rasta s fotoperiodom od 16 sati svjetla i 8 h tame. Ukupno njih 33 (od svakog citokinina po 4 koncentracije, a svaka koncentracija po 4 Magenta posudice i 1 kontrolni medij bez dodatka citokinina).

## 3.5. Priprema hranjive podloge

U ovom pokusu korišten je modificirani „*Woody Plant*“ (WPM, Lloyd i McCown, 1980) medij za multiplikaciju i za tretmane zakorjenjivanja (Tablica 3.1.). Za pripremu ove podloge korištene su koncentrirane matične otopine potrebnih makro i mikro elementa te vitamini, mio-inozitol, saharoza i sequestren (prema Syngenta Crop Protection AG, sequestren je željezni helat u obliku vodotopivih mikrogranula, namijenjen za sprječavanje i suzbijanje kloroze izazvane nedostatkom pristupačnog željeza.) i Plant agar prema protokolu prikazanom u Tablici 3.1. Ovaj medij odabran je zbog pozitivnih iskustava iz prethodnih istraživanja u Laboratoriju na Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.

Hranidbene podloge su sterilizirane u autoklavu 25 min na 121 °C pri tlaku od 1 bara. Dodavanje hormona (citokinina) u medij slijedilo je na način da je BAP dodan prije autoklaviranja, a mT nakon istog procesa. To je učinjeno iz razloga zato što je mT termolabilan i pri visokim temperaturama može doći do promjene njegovih svojstva i krajnjeg djelovanja. Također, optimizirana je pH vrijednost medija na 5,8.

Tablica 3.1. Sastav hranjive podloge korištene u pokusu

| Sastav | Koncentracija (mg/l) |
|---|---|
| **Makroelementi** | |
| NH4NO3 | 400 |
| CaCl2 x 2H20 | 95,65 |
| MgSO4 x 7H2O | 370 |
| KH2PO4 | 170 |
| Ca(NO3)2 x 4H20 | 55,95 |
| K2SO4 | 990 |
| $FeSO_4$ x $7H_2O$ | 5,57 |
| $Na_2EDTA$ x $2H_2O$ | 7,47 |
| **Mikroelementi** | |
| $CuSO_4$ x $5H_2O$ | 0,0025 |
| $CoCl_2$ x $6H_2O$ | 0,0025 |
| $H_3BO_3$ | 0,62 |
| KI | 0,083 |
| $MnSO_4$ x $H_2O$ | 1,689 |
| $Na_2MoO_4$ x $2H_2O$ | 0,025 |
| $ZnSO_4$ x $7H_2O$ | 0,86 |
| **Plant agar** | 7g/l |
| **Vitamini** | |
| MS vitamini | 1 ml |
| **Šećeri** | |
| Saharoza | 30 g |
| **Organski dodaci** | |
| Mio-inozitol | 0,1 g |
| **Željezo** | |
| Sequestren (helatirano Fe) | 0,1305 g |

### 3.5.1. Medij za multiplikaciju

Pokus je postavljen na način da su prvo izdanci postavljeni na medij za multiplikaciju izdanaka gdje se provodilo umnožavanje do željenog broja biljaka. Izdanci duljine 2-3 nodija postavljeni su okomito u hranidbeni medij.

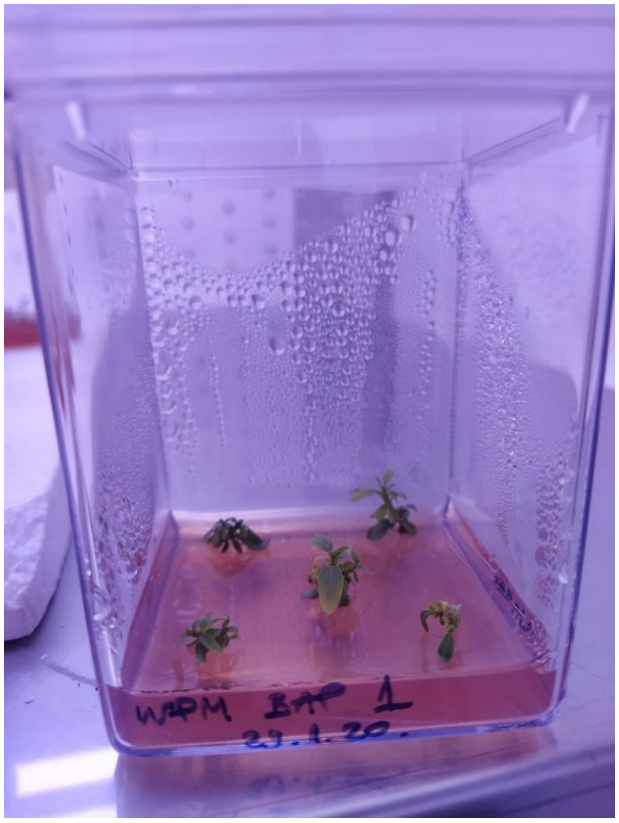
Za multiplikaciju izdanaka korišten je WPM medij s dodatkom dva različita biljna hormona. To su citokinini 6-benzilaminopurin (BAP) i meta-topolin (mT). Navedeni citokinini dodani su u hranidbeni medij u 4 različite koncentracije kako je prikazano u Tablici 3.2.

Ukupno je bilo 8 različitih tretmana za multiplikaciju izdanaka (4 koncentracije od jednog i 4 koncentracije od drugog hormona) i jedna kontrola bez regulatora rasta. Od svake koncentracije postavljene su 4 Magenta posudice sa 5 postavljenih eksplantata u svakoj. Dakle, po tretmanu je postavljeno ukupno 20 eksplantata.

Provedene su dvije supkultivacije u kojima su izdanci umnažani i supkultivirani uvijek u mediju istog sastava, a period supkultiviranja trajao je šest tjedana. Potom je bilježena stopa multiplikacije i dužina izdanaka. Stopa multiplikacije izdanaka izražena je kao broj izdanaka razvijenih po izdanku postavljenom na medij za multiplikaciju.

Tablica 3.2. Medij za multiplikaciju izdanaka s različitim koncentracijama citokinina

| Vrsta medija | Tip | Vrsta regulatora rasta | Koncentracija (mg/l) | Kratica medija |
|---|---|---|---|---|
| Medij za multiplikaciju izdanaka | 1. Tretman | **mT** | 0,5 | mT 0,5 |
| | | | 1 | mT 1 |
| | | | 2 | mT 2 |
| | | | 4 | mT 4 |
| | 2. Tretman | **BAP** | 0,5 | BAP 0,5 |
| | | | 1 | BAP 1 |
| | | | 2 | BAP 2 |
| | | | 4 | BAP 4 |
| | 3. Kontrola | bez hormona | / | / |




Slika 3.1. Eksplantati kapara u Magenta posudi na WPM hranjivom mediju s dodatkom BAP-a
(Autor: Ena Koščec)

### 3.5.2. Medij za zakorjenjivanje

Nakon provedene multiplikacije, dobili smo željeni broj izdanaka koji su postavljeni su na medij za zakorjenjivanje. Tretiranje izdanaka trajalo je 10 minuta (Tablica 3.3.) uranjanjem u otopinu 10 mg/l IBA-e (indolil-3-maslačna kiselina) i 10 minuta u destiliranoj vodi bez dodatka regulatora rasta koja je poslužila kao kontrola (bez auksina IBA-e). Nakon tretmana za zakorjenjivanje/kontrole izdanci su postavljeni na HFM (engl. *hormon free medium*). Nakon 60 dana su izvršena opažanja i izmjere te su zakorjenjeni izdanci posađeni u supstrat u posude promjera 10 cm radi aklimatizacije.

Tablica 3.3. Shema medija za zakorjenjivanje

| Vrsta medija | Tip | Vrsta regulatora rasta | Koncentracija (mg/l) | Trajanje (min) |
|---|---|---|---|---|
| Medij za zakorjenjivanje | 1. Tretman | **IBA** | 10 | 10 |
| | 2. Tretman | Kontrola, bez hormona (HFM) | destilirana voda | 10 |

## 3.6. Statistička analiza podataka

Svojstva opažanja (mjerenja) u ovom pokusu bila su prosječan broj izdanaka, prosječna duljina izdanaka (mm), uspješnost zakorjenjivanja i aklimatizacije te karakteristike korijena: dužina korijenja (cm), površina korijenja (cm2), prosječni promjer korijenja (mm) i broj vrhova korijena. Za karakteristike korijena napravljena je višefaktorijelna analiza varijance (ANOVA), a srednje vrijednosti uspoređene su Duncan-ovim testom u statističkom programu SAS 9.2. (SAS Institute, 2009) uz razinu značajnosti $p \leq 0,05$ (Duncan, 1955).

Podaci o broju i duljini izdanka razvijenih na hranidbenom mediju s dodatkom citokinina te podaci o uspješnosti zakorjenjivanja i aklimatizacije obrađeni su mjerom deskriptivne statistike.

# 4. REZULTATI I RASPRAVA

## 4.1. Uspješnost multiplikacije ovisno o citokininima

Mjerenje prosječnog broja formiranih izdanaka i prosječne duljine izdanka (mm) provedeno je 48 dana nakon postavljanja eksplantata na hranidbeni medij s dodatkom citokinina u svrhu multiplikacije. Podaci prikazani u Tablici 4.1. prikazuju prosječan broj izdanaka za svaki citokinin (mT i BAP), a mjereni su za svaku koncentraciju pojedinog citokinina zasebno. Jednako tako prikazani su podaci za prosječnu duljinu izdanka koja je izražena u milimetrima.

U ovom istraživanju, BAP je pri najvišoj korištenoj koncentraciji (4 mg/l) dao najveći prosječni broj formiranih izdanaka, a to je 4.6 (Tablica 4.1.), dok je pri 4 mg/l mT-a prosječno formirano 4.2 izdanka. Najveći prosječni broj formiranih izdanaka kod mT-a je pri koncentraciji od 0,5 mg/l.

Bairu i sur. (2007) navode kako su u svom istraživanju uočili da među različitim ispitivanim koncentracijama citokinina u hranjivom mediju postoje značajne razlike u ukupnom broju izdanaka. Pri nižim koncentracijama BAP je stvorio više izdanaka, a kako se koncentracija citokinina povećavala, veći broj izdanaka uočili su kod tretmana meta-topolinom što je u našem istraživanju drugačije. Također, Kereša i sur. (2019) navode da su pri vrlo niskim koncentracijama (0,2 i 0,4 mg/l) BAP i mT stvorili sličan broj novih izdanaka po eksplantatu, a kako se koncentracija povećavala, povećavale su se i razlike u broju formiranih izdanaka.

Benmahioul i sur. (2012) u svojem istraživanju navode kako je najveći broj formiranih izdanaka očekivan kod medija s 4 mg/l BAP-a, no prema njihovim rezultatima najbolji prosječni broj korisnih izdanaka i najbolje duljine stabljika dobivene su na podlogama obogaćenim s 2 mg/l mT-a. Također, u istraživanju Werbrouck i sur. (1996) navode da je *Spathiphyllum floribundum* Schott Petite razvila značajno manje izdanaka (<1.5 cm) na mediju s BAP-om. Na temelju podataka ovog istraživanja (Tablica 4.1.) utvrđeno je da je najveći prosječni broj formiranih izdanaka bio kod predtretmana s 4 mg/l BAP-a (4.6), a najveća prosječna duljina izdanka (mm) bila je također na mediju s dodatkom BAP-a (16.1) ali u ovom slučaju pri koncentraciji od 0,5 mg/l. U odnosu na mT, prosječan broj izdanaka (kod koncentracija 0,5, 1 i 2 mg/l) bio je manji na mediju s BAP-om. Prosječna duljina izdanka (mm) također je bila manja u slučaju BAP-a u mediju s koncentracijama 1,2 i 4 mg/l. Jednako tako navode i Gentile i sur. (2017) u svom istraživanju gdje je mT stvorio duže izdanke u odnosu na BAP, bez obzira na primjenjenu koncentraciju.

Iako je koncentracija od 4 mg/l mT-a kod *Spathiphyllum floribundum* Schott Petite inducirala manji ukupan (prosječni) broj izdanaka nego ista koncentracija BAP-a (Werbrouck i sur., 1996), broj duljih izdanaka je značajno veći. U ovom istraživanju te razlike su vidljive (Tablica 4.1.) kao i kod Werbrouck i sur. (1996).

Tablica 4.1. Podaci o multiplikaciji izdanaka

| Tretman citokininom | Prosječan broj izdanaka | Prosječna duljina izdanka (mm) |
|---|---|---|
| mT 0,5 | 4.3 | 11.2 |
| BAP 0,5 | 2.8 | **16.1** |
| mT 1 | 3.3 | 12 |
| BAP 1 | 2.1 | 5.1 |
| mT 2 | 3.8 | 9.3 |
| BAP 2 | 3.1 | 8.1 |
| mT 4 | 4.2 | 8.1 |
| BAP 4 | **4.6** | 6.3 |

* 0,5, 1, 2 i 4 – koncentracije pojedinog citokinina u mediju izražena u mg/l

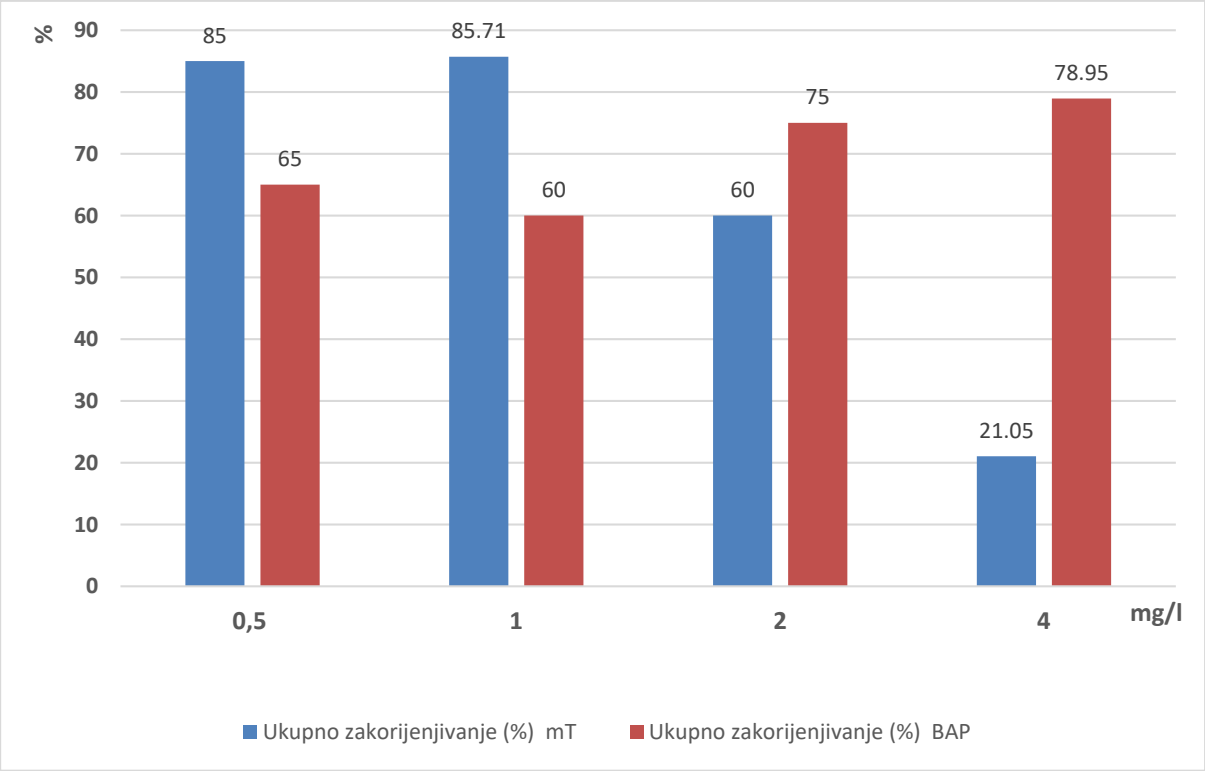
## 4.2. Utjecaj citokinina korištenih u fazi multiplikacije i tretmana zakorjenjivanja na uspješnost zakorjenjivanja

Uspješnost zakorjenjivanja procjenjena je 60 dana nakon provedenog tretmana za zakorjenjivanje. U nastavku teksta opisan je utjecaj tretmana za zakorjenjivanje (s auksinom IBA u hranidbenom mediju) i utjecaj tretmana citokininima u fazi multiplikacije izdanaka te postoji li korelacija u djelovanju citokinina i auksina tj. nadopunjuju li se ili međusobno poništavaju svoj učinak prilikom prisutnosti drugog, a u svrhu stvaranja korijena. Utvrdili smo je li tretman auksinom IBA ili tretman na mediju bez dodatka hormona (HFM) dao bolje rezultate (u kombinaciji s prethodnim tretmanom citokininima).

### 4.2.1. Utjecaj citokinina korištenih u fazi multiplikacije izdanaka i tretmana s IBA-om na uspješnost zakorjenjivanja

Budući da je BAP citokinin koji se zadržava u bazalnom dijelu biljke i sporije translocira u druge dijelove u odnosu na mT te zbog toga može uzrokovati heterogenosti u rastu i inhibiciju zakorjenjivanja bilo je za očekivati da će manje koncentracije BAP-a u hranidbenom mediju dati bolje rezultate na uspješnost zakorjenjivanja. Pretpostavka je bila da će velike koncentracije BAP-a, koje bi se zadržale u biljci, umanjiti utjecaj naknadno dodanog auksina (IBA) kojemu je svrha potaknuti zakorjenjivanje i time uzrokovati manji postotak ukupnog zakorjenjivanja.

Rezultatima ovog istraživanja utvrdili smo da postoji razlika između utjecaja mT-a i BAP-a koji su bili u hranidbenom mediju za multiplikaciju izdanaka na uspješnost zakorjenjivanja. Izdanci koji su bili postavljeni na hranidbeni medij s dodatkom mT-a pokazali su manje negativno djelovanje na zakorjenjivanje pri nižim koncentracijama tog citokinina na hranidbenom mediju. Npr. najmanje negativno djelovanje mT-a u zakorjenjivanju postoji kod tretmana s 1 mg/l mT-a (Graf 4.1.) Pri toj koncentraciji postotak zakorjenjivanja bio je čak 85.71% (uz dodatak IBA-e u drugoj fazi). Dok je pri najvišoj koncentraciji od 4 mg/l mT-a uočljiv veći negativan utjecaj na zakorjenjivanje koje je bilo niskih 21.05%. Kod viših koncentracija mT-a u hranjivom mediju postoji veći negativan utjecaj na zakorjenjivanje jer rezultati pokazuju (Graf 4.1.) manji postotak ukupno zakorjenjenih biljaka.



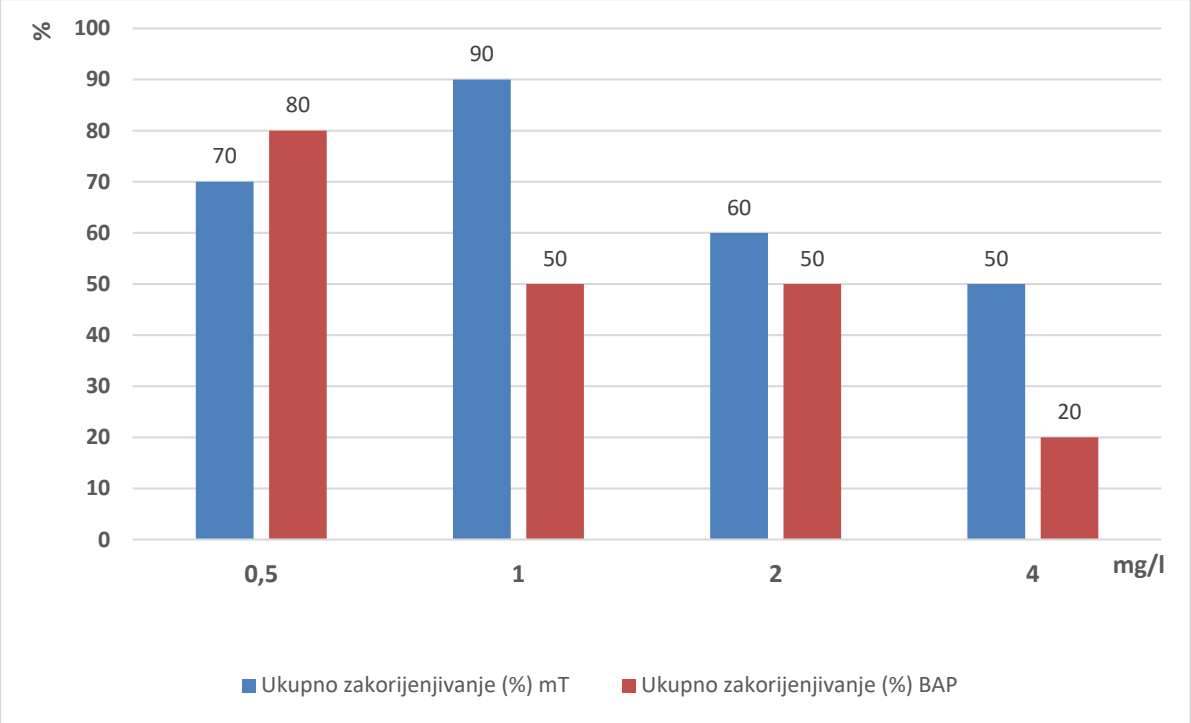

Graf 4.1. Zakorjenjivanje izdanaka kapara nakon tretmana s auksinom IBA (%) ovisno o citokininima korištenim u fazi multiplikacije

Za razliku od mT-a, rezultati su nešto drugačiji u slučaju s BAP-om. Pri istoj koncentraciji od 1 mg/l BAP-a (gdje je mT pokazao najveću uspješnost zakorjenjivanja) ukupno zakorjenjivanje bilo je 60% (Graf 4.1.) što je najniži postotak uspješnog zakorjenjivanja kod medija s dodatkom BAP-a, kada gledamo sve četri istraživane koncentracije u mediju (nakon čega je slijedio treman s auksinom IBA). Najbolji rezultati za zakorjenjivanje, prilikom dodatka BAP-a u hranidbeni medij tijekom multiplikacije izdanaka, utvrđeni su pri koncentraciji od 4 mg/l ovog citokinina pri čemu je zakorjenilo 78.97% biljaka.

Prema Benmahioul i sur. (2012) medij za multiplikaciju izdanaka *Pistacia vera* L. nije imao utjecaj na zakorjenjivanje izdanaka (carry over efekt). Međutim, mikroizdanci *Pistacia vera* L. razvijeni na mediju za multiplikaciju s mT imali su veći postotak zakorjenjivanja (82,5 %) za razliku od onih formiranih na mediju s BAP-om, gdje je zakorjenjivanje rezultiralo nižim postotkom (75%). Također, Gentile i sur (2017) navode da su izdanci od *Corylus colurna* L. uzgajani u prisutnosti mT-a dali su veći postotak (98% kod 1 mg/l mT i 100% kod 2 mg/l mT) ukorjenjenih biljaka od izdanka tretiranih s BAP-om (78,26% kod 1 mg/l BAP i 50,33% kod 2 mg/l BAP).

### 4.2.2. Utjecaj citokinina korištenih u fazi multiplikacije i tretmana bez dodatka auksina na uspješnost zakorjenjivanja

U slučaju kontrolnog tretmana (nakon tretmana citokininima u fazi multiplikacije izdanaka nije dodan auksin u medij tretmana za zakorjenjivanje – HFM tretman) rezultati su malo drugačiji. Utvrđeno je da mT u koncentraciji od 1 mg/l u hranidbenom mediju rezultirao je najmanje negativno djelovanje u zakorjenjivanju. Zakorijenilo je 90% izdanaka (Graf 4.2.) ali u ovom slučaju bez prisutnosti auksina IBA-e u tretmanu za zakorjenjivanje. Povećanjem koncentracije mT korištenog u fazi multiplikacije na 4 mg/l povećava se i negativan utjecaj na zakorjenjivanje i u tom slučaju je u kontrolnom tretmanu zakorjenjivanja zakorjenilo tek 50% izdanaka. S druge strane, iz grafa 4.2. je vidljiv negativniji utjecaj BAP-a korištenog u fazi multiplikacije na zakorjenjivanje jer je postotak zakorjenjivanja najveći nakon koncentracije od 0,5 mg/l (80%). Pri povećanju koncentracije BAP-a na 1 mg/l, u fazi zakorjenjivanja se smanjuje uspješnost zakorjenjivanja na 50% dok je kod koncentracije od 4 mg/l BAP-a korištenog u fazi multiplikacije izdanaka, u kontrolnom tretmanu zakorjenjivanja tek 20% izdanaka uspjelo razviti korijenje.




Graf 4.2. Zakorjenjivanje izdanaka kapara (%) nakon kontrolnog tretmana za zakorjenjivanje (bez dodatka auksina) ovisno o citokininima korištenim u fazi multiplikacije

## 4.3. Utjecaj citokinina korištenih u fazi multiplikacije izdanaka i tretmana za zakorjenjivanje na karakteristike korijena

Statističkom obradom rezultata ovog istraživanja utvrđeno je da nema značajnog utjecaja citokinina korištenih u fazi multiplikacije izdanaka (citokinin BAP i mT) na karakteristike korijena. Dužina korijenja (cm), površina ($cm^2$), prosječan promjer korijenja (mm) i broj vrhova korijena izmjereni su upotrebom WinRhizo softvera (Tablica 4.2). Iako je sama uspješnost zakorjenjivanja bila veća kod izdanaka multipliciranih na mediju s dodatkom mT-a u odnosu na BAP, korijenje veće dužine je razvijeno kod izdanaka multipliciranih na medijima s dodatkom BAP-a (11.9 cm) u odnosu na izdanke multiplicirane na medijima s dodatkom mT-a (8,49 cm), jednako kao i površina korijenja (1,83 $cm^2$ s BAP-a u odnosu na 1,29 $cm^2$ s mT-a) te broj vrhova korijena (40,5 s BAP-a i 28 s mT-a), međutim ove razlike nisu statistički značajne.

Najmanja dužina korijenja, površina korijenja i broj vrhova korijenja izmjerena je kod izdanaka razvijenih na najmanjoj koncentraciji citokinina (0,5 mg/l) dok su najveće vrijednosti ovih parametara izmjerene na najvećoj koncentraciji citokinina (4 mg/l). Međutim, razlike između različitih koncentracija navedenih citokinina nisu bile statistički značajne.

Tablica 4.2. Karakteristike korijena ovisno o citokininima korištenim u fazi multiplikacije izdanaka

| citokinin | dužina korijenja (cm) | površina korijenja(cm2) | prosječni promjer korijenja (mm) | broj vrhova korijenja |
|---|---|---|---|---|
| mT | 8,49 a | 1,29 a | 0,51a | 28 a |
| BAP | 11,9 a | 1,83 a | 0,44 a | 40,5 a |

*Vrijednosti unutar iste kolone, označene istim slovom ne razlikuju se značajno prema Duncan testu uz *p<0,05*

Kada promatramo tretmane zakorjenjivanja, najveći prosječni promjer korijenja (0,58 mm) izmjeren je kod izdanaka s tretmana IBA-om, a kod izdanaka multipliciranih na medijima s dodatkom mT-a. S druge strane, puno manji broj vrhova po jednom korijenu gdje se korijen nije razgranao za razliku od ostalih izmjereno je kod tretmana koji je poslužio kao kontrola, medij bez hormona (HFM), a kod izdanaka također multipliciranih na medijima s dodatkom mT-a (Tablica 4.3.).

Tablica 4.3. Utjecaj citokinina korištenih u fazi multiplikacije izdanaka i tretmana za zakorjenjivanje na karakteristike korijenja

| tretman | dužina korijenja (cm) | površina korijenja(cm2) | prosječni promjer korijenja(mm) | broj vrhova korijenja |
|---|---|---|---|---|
| mT u fazi multiplikacije – kontrolni tretman zakorjenjivanja | 4,3 a | 0,55 a | 0,4b | 16.26b |
| BAP u fazi multiplikacije – kontrolni tretman zakorjenjivanja | 12,2 a | 1,69 a | 0,41b | 52.85a |
| mT u fazi multiplikacije – tretman zakorjenjivanja s IBA-om | 11,06 a | 1,75 a | 0,58a | 35.205a |
| BAP u fazi multiplikacije – tretman zakorjenjivanja s IBA-om | 11,7 a | 1,87 a | 0.46ab | 35.81a |

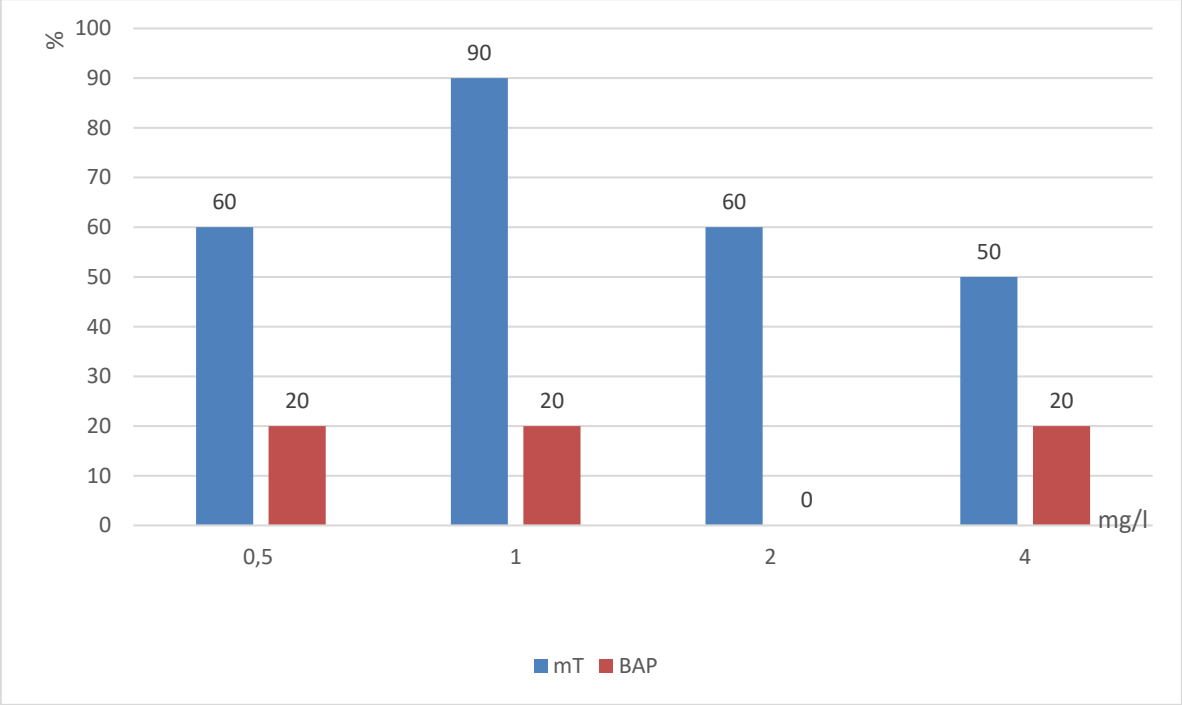
*Vrijednosti unutar iste kolone, označene istim slovom, ne razlikuju se značajno prema Duncan testu uz p<0,05

## 4.4. Aklimatizacija

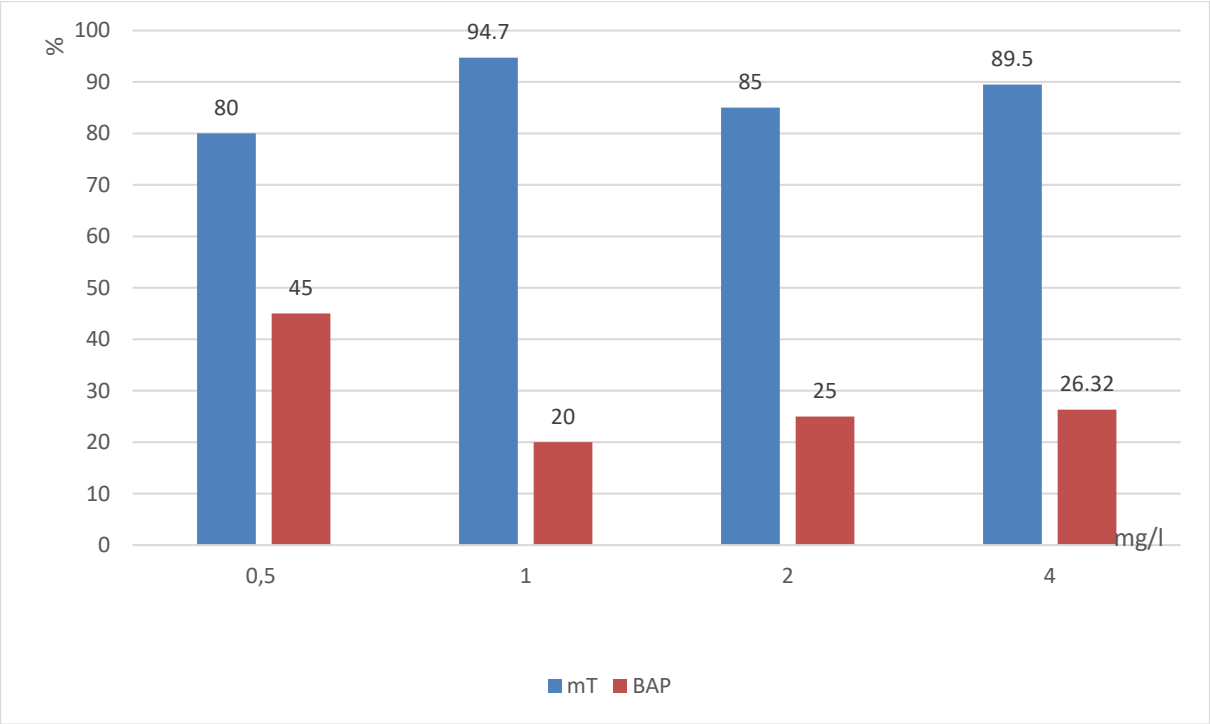
Nakon uspješnog zakorjenjivanja biljke su premještene u *in vivo* uvjete gdje su prošle kroz proces aklimatizacije tijekom koje je utvrđen ukupan broj uspješno aklimatiziranih biljaka u odnosu na postavljene na početku ovog pokusa.

Biljke koje su bile formirane na mediju s citokininima u fazi multiplikacije izdanaka, pa na mediju za zakorjenjivanje s auksinom IBA (Graf 4.4.) rezultiraju nešto višim postocima u uspješnosti aklimatizacije u odnosu na postotak uspješno aklimatiziranih biljaka formiranih na mediju s citokininima, a potom na mediju za zakorjenjivanje bez dodatka auksina. (Graf 4.3.). Biljke formirane na mediju s dodatkom mT-a, u sve četiri koncentracije, rezultirale su boljim postotkom aklimatizacije (u odnosu na postavljene biljke) kada ih uspoređujemo s onima formiranim na mediju s BAP-om. Najveća uspješnost aklimatizacije izdanaka formiranih na mediju s dodatkom mT, zakorjenjenih tretmanom s IBA-om iznosi 94,7% dok je kod izdanaka multipliciranih na tretmanu s BAP-om aklimatizirano maksimalno 45% biljaka. U skladu s našim rezultatima su i rezultati istraživanja Werbrouck i sur., (1996) prema kojem biljke razvijene na mediju s 10 µM mT-a (oko 2 mg/l mT-a), ili više, zakorjenjuju bolje (više korijena po eksplantatu, veći ukupan broj korijena po eksplantatu) tijekom aklimatizacije nego biljke na mediju s ekvimolarnim koncentracijama BAP-a.

Također Benmahioul i sur. (2012) navode da su mikroizdanci formirani na mediju s mT imali veću uspješnost zakorjenjivanja *ex vitro* (82,5%) u usporedbi s onima tretiranim s BAP-om (75%). Moguće objašnjenje je u sporom otpuštanju BAP-a iz mjesta skladištenja što može uzrokovati različite probleme tijekom aklimatizacije u stakleniku poput heterogenosti u rastu i inhibiciju zakorjenjivanja (Werbrouck i sur. 1996).




Graf 4.3. Aklimatizacija izdanaka kapara (%) nakon kontrolnog tretmana za zakorjenjivanje (bez dodatka auksina) ovisno o citokininima korištenim u fazi multiplikacije




Graf 4.4. Aklimatizacija izdanaka kapara nakon tretmana s auksinom IBA (%) ovisno o citokininima korištenim u fazi multiplikacije

# 5. ZAKLJUČAK

Cilj istraživanja u sklopu ovog diplomskog rada bio je utvrditi stopu multiplikacije i uspješnost zakorjenjivanja biljke kapar (*Capparis orientalis* Veill) ovisno o citokininima korištenim u fazi multiplikacije izdanaka i istražiti je li koji od ta dva citokinina u hranidbenom mediju ima bolji utjecaj na formiranje korijena. Eksplantati kapara uvedeni u kulturu uspješno su multiplicirani na predtretmanu s dodatkom citokinina (BAP i mT) u *Woody Plant* mediju (WPM) te su nakon toga zakorjenjeni.

Optimizacija *in vitro* uvjeta kulture tijekom mikrorazmnožavanja i koncentracija pojedinih regulatora rasta u hranidbenom mediju individualne su za svaku biljnu vrstu, pa tako i za kapar korišten u ovom istraživanju. Pokazalo se da biljke formirane na mediju s nižim koncentracijama mT-a (0,5 i 1 mg/l) bolje zakorjenjuju i u slučaju kasnije korištenog auksina IBA ili medija bez auksina. Kod BAP-a su bili drugačiji rezultati, pa je veći postotak zakorjenjivanja bio pri višim koncentracijama (2 i 4 mg/l) u slučaju kasnijeg dodatka auksina, a kada u medij za zakorjenjivanje nije dodan auksin IBA, najveći postotak zakorjenjivanja bio je pri 0,5 mg/l BAP-a. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da nema značajne razlike u zakorjenjivanju ovisno o različitim koncentracijama citokinina BAP-a i mT-a u predtretmanima. Međutim, korištenjem niskih koncentracija ovih citokinina postignuta je uspješna multiplikacija izdanaka te nije bilo negativnog učinka derivata BAP na stvaranje korijena.

Objašnjenje ovih rezultata moglo bi biti to što npr. auksin u visokoj koncentraciji može inhibirati morfogenezu tj. rast stanica. To se događa jer auksin inducira proizvodnju etilena koji zatomljuje produžni rast stanica. Također, biljka i prirodno sama sintetizira citokinine i uz dodatak egzogenih regulatora rasta ne može razgraditi veliku količinu hormona što može sprječavati ili usporavati usvajanje naknadno dodanih auksina. To može rezultirati negativnim učinkom, odnosno može doći do inhibicije pojedinih procesa kao npr . u ovom slučaju zakorjenjivanja.

Različiti citokinini, u ovom slučaju mT i BAP, različitim se tempom razgrađuju u biljnom tkivu. Zbog toga imaju drugačiji utjecaj na auksine dodane u kasnijoj fazi kada nakon multiplikacije želimo formirati korijen biljke stoga su optimalne koncentracija dodanih regulatora rasta u hranidbeni medij od iznimne važnost. Regulatori rasta korišteni u kulturi tkiva mogu imati značajan utjecaj na kvalitetu zakorjenjenih izdanaka i na njihovu sposobnost aklimatizacije u *in vivo* uvjetima tj. pokazuju svojevrsni *carry over* efekt prethodnog medija. Rezultati pokazuju da biljke formirane na mediju s mT imaju najviši postotak uspješne aklimatizacije pri 1 mg/l mT-a u mediju predtretmana (i bez auksina u mediju za zakorjenjivanje i sa auksinom IBA), dok su biljke formirane na mediju s BAP-om pokazale najbolji postotak aklimatizacije uz dodatak 0,5 mg/l BAP-a (s auksinom IBA u mediju za zakorjenjivanje). Daljnim istraživanjima ostaje utvrditi koje su optimalne koncentracije citokinina i auksina u hranidbenom mediju za mikrorazmnožavanje *C. orientalis* Veill., koje će utjecati na brže i bolje zakorjenjivanje i aklimatizaciju.

# 6. LITERATURA


1. Aremu, A. O., Bairu, M. W., Szücová, L., Finnie, J. F., Staden, J. V. (2012). The role of meta-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated 'Williams' bananas. Journal of Plant Physiology 169, 1530-1541
2. Bairu, M. W., Stirk, W. A., Dolezal, K., Staden, J. V. (2007). Optimizing the micropropagation protocol for the endangered Aloe polyphylla: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin?. Plant Cell Tiss Organ Cult, 90:15–23, DOI: 10.1007/s11240-007-9233-4.
3. Benmahioul, B., Dorion, N., Kaid-Harche, M., Daguin, F. (2012). Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (Pistacia vera L.). Plant Cell Tiss Organ Cult. 108:353–358
4. Bošnjak Mihovilović, A., Habuš Jerčić, I., Prebeg, T., Tomaz, I., Pavičić, A., Barić, M., Kereša, S. (2020). Light Source and Cytokinin Type Affect Multiplication Rate, Chlorophyll Content and Stomata Formation of Amelanchier alnifolia Shoots in Vitro. Journal of Central European Agriculture. Faculty of Agriculture, University of Zagreb. 21(4), p.826-838 [online] Izvor: https://jcea.agr.hr/en/issues/article/2909 (pristupljeno: 28.02.2021.)
5. Carra, A., Sajeva, M., Abbate, L., Siragusa, M., Sottile, F., Carimi, F. (2012). In vitro plant regeneration of caper (Capparis spinosa L.) from floral explants and genetic stability of regenerants. Plant Cell Tiss Organ Cult, 109:373–38.
6. Carra, A., Del Signore, M. B., Sottile, F., Ricci, A., Carimi, F. (2011). Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of Capparis spinosa L. Plant Growth Regul (2012) 66:229–237. [online] Pristupljeno: 17.05.2021.
7. Chedraoui S., Abi-Rizk A., El-Beyrouthy M., Chalak L., Ouaini N., Rajjou L. (2017). Capparis spinosa L. in A Systematic Review: A Xerophilous Species of Multi Values and Promising Potentialities for Agrosystems under the Threat of Global Warming
8. Drvodelić, D. Priručnik za razmnožavanje drvenastih vrsta. [online]. Izvor: https://issuu.com/natalija1106/docs/prirucnik_za_razmnozavanje/23 (pristupljeno: 20.03.2021.)
9. Duncan, D. B. (1955): Multiple range and multiple F tests. Biometrics 11: 1-42
10. El amri, N., Errachidi, F., Bour, A., Bouhaddaoui, S., Chabir R. (2019). Morphological and Nutritional Properties of Moroccan Capparis spinosa Seeds. The Scientific World Journal. Article ID 8594820, 8 pages Izvor: https://doi.org/10.1155/2019/8594820
11. Gan, L., Zhang, C., Yin, Y., Lin, Z., Huang, Y., Xiang, J., et al. (2013). Anatomical adaptations of the xerophilous medicinal plant, *Capparis spinosa*, to drought conditions. *Hortic. Environ. Biotechnol*. 54, 156–161.
12. Gentile, A., Frattarelli1, A., Nota1, P., Condello, E., Caboni, E. (2017). The aromatic cytokinin meta-topolin promotes in vitro propagation, shoot quality and micrografting in Corylus colurna L. Plant Cell Tiss Organ Cult, 128:693–703
13. Grlić, Lj. (2005). Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Ex libris, Zagreb.

14. Güleryüz, M., Özkan, G., Ercisli, S. (2009). Caper (Capparis spp.) growing techniques and economical importance. 1st International Symposium on Sustainable Development, 09.-10. lipnja 2009., Sarajevo, Bosna i Hercegovina: 94-97. [online] Izvor: https://core.ac.uk/download/pdf/153447222.pdf (pristupljeno 10.01.2021.)
15. Inocencio, C., Rivera, D., Obon, M.C., Alcaraz, F., Barrena, J.A. A systematic revision of Capparis section Capparis (Capparaceae). Ann. MO. Bot. Gard. 2006, 93, 122–149.
16. Jafari, N., Othman, R. Y., Khalid, N. (2011). Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on in vitro shoot multiplication of Musa acuminata (banana) cv. Berangan. African Journal of Biotechnology Vol. 10(13), pp. 2446-2450 [online] Izvor: http://www.academicjournals.org/AJB (pristupljeno: 20.03.2021.)
17. Jelaska S. (1994). Kultura biljnih stanica i tkiva, temeljna istraživanja i primjena. Školska knjiga, Zagreb.
18. Kereša, S., Stanković, D., Batelja Lodeta, K., Habuš Jerčić, I., Bolarić, S., Barić, M., Bošnjak Mihovilović, A. (2019). Efficient Protocol for the In Vitro Plantlet Production of Caper (*Capparis orientalis* Veill.) from the East Adriatic Coast. [online] Izvor: https://doi.org/10.3390/agronomy9060303 **(**pristupljeno: 04.05.2021.)
19. Kieber J. J., Schaller G. E. (2014). The Arabidopsis book. American society of plant biologists. [online] Izvor: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894907/ (pristupljeno 30. siječnja 2021.)
20. Kovačević, R. (2014). Mediteranski vrt. Cvijet kapara. [online] Izvor: https://www.slideshare.net/AMER9437/mc-27 (pristupljeno 14.01.2021.)
21. Kuštrak D. ( 2014). Morfološka I mikroskopska analiza začina. Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb.
22. Lazarević, B., Poljak, M. (2019). Fiziologija bilja. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za ishranu bilja. 85-86 [online] Izvor: https://repozitorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr:1240 (pristupljeno: 30.01.2021.)
23. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26–30 August 2002.
24. Marković, Z., Preiner, D. (2011). Biotehnologija u vinogradarstvu. Pregledni rad. Glasnik zaštite bilja.
25. Mohammad, S. M., Kashani, H. H., Azarbad Z. (2012). Capparis spinosa L. Propagation and Medicinal uses. Life Science Journal;9(4). Agronomy and Plant Breeding Department,Saveh branch,Islamic Azad University,Iran, Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
26. Musallam, I., Duwayri, M., Shibli, R. A. (2011). Micropropagation of Caper (Capparis spinosa L.) from Wild Plants. Functional plant science and Biotechnology 5(1): 17-21
27. Mutui, T. M., Mibus, H., Serek, M. (2012). Effect of meta-topolin on leaf senescence and rooting in Pelargonium × hortorum cuttings. Postharvest Biology and Technology 63, 107-110.
28. Panico, AM., Cardile, V., Garufi, F., Puglia, C., Bonina, F., Ronsisvalle, G. (2005.). Protective effect of Capparis spinosa on chondrocytes. Life Sciences 77. [online] 479–2488, Izvor: Link (pristupljeno 14.01.2021.)

29. Pevalek-Kozlina, B. (2003). Fiziologija bilja. Profil International, Zagreb.

30. Pintarić, B. (2008). Mikropropagacija bijele topole. Šumarski list br. 7-8, 343-354
31. Plíhal, O., Szüčová, L., Galuszka, P. (2013). N9-substituted aromatic cytokinins with negligible side effects on root development are an emerging tool for in vitro culturing. Plant Signaling & Behavior 8:6, e24392. Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research; Faculty of Science; Palacký University; Olomouc, Czech Republic. (pristupljeno: 20.03.2021.)

32. Saadaoui, E., Guetat, A., Tlili, N., El Gazzah, M., Khaldi, A. (2011). Subspecific variability of Tunisian wild populations of *Capparis spinosa* L. Journal of Medicinal Plants Research. 5(17): 4339-4348.
33. Sher, H., Alyemeni, N.M. (2010). Ethnobotanical and pharmaceutical evaluation of Capparis spinosa L., validity of local folk and Unani system of medicine. Journal of Medicinal Plants Research 4(17): 1751-1756.
34. Souza, L. M., Ribeiro Barbosa, M., Zárate-Salazar, J. R., Lozano-Isla F., Camara, T. R. (2019). Use of meta-Topolin, an unconventional cytokinin in the in vitro multiplication of Opuntia stricta Haw. Biotecnología Vegetal Vol. 19, No. 2: 85 – 96. 1Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Chemistry, Federal Rural University of Pernambuco. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos. Recife. PE. Brazil. 52171-900.
35. Soyler, D. ; Mahmood Khawar K. (2007). Seed Germination of Caper (Capparis ovata var. Herbacea) Using α Naphthalene Acetic Acid and Gibberellic Acid. International journal of agriculture & biology 1560–8530//09–1–35–37
36. Syngenta Hrvatska. Sequestrene Life, Mineralno gnojivo. Izvor: https://www.syngenta.hr/product/crop-protection/mineralno-gnojivo/sequestrene-life (pristupljeno: 27.03.2021.)
37. Škvorc, Ž., Sever, K., Franjić, J. (2013). Fiziologija šumskog drveća. Interna skripta. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet. [online]. Izvor: https://dokumen.tips/documents/fiziologija-skriptapdf.html (pristupljeno: 21.03.2021.)
38. Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. Centre for Plant Molecular Biology (ZMBP)/ Allgemeine Genetik, Universita¨t Tu¨ bingen, Auf der Morgenstelle 28, D-72076 Tubingen, Germany.
39. Tivendale, N. D., Ross, J. J., Cohen, J. D. (2014). The shifting paradigms of auxin biosynthesis. Trends in Plant Science Vol. 19, No. 1.
40. Werbrouck, S. P. O., Strnad, M., Onckelen, A., Debergh, P. C. (1996). Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? Physiologia plantarum 98:291-297

# Popis kratica

| | | |
|---|---|---|
| BAP | - | 6-benzilaminopurin |
| BAP9G | - | 6-benzil-amino-9-β-D-glukopiranozilpurin |
| HFM | - | eng. Hormon free medium |
| IBA | - | indol-3-maslačna kiselina |
| MS | - | eng. Murashige and Skoog medium (1962) |
| mT | - | meta-topolin |
| ROS | - | eng. Reactive oxygen species |
| WPM | - | eng. Woody Plant medium |

# Životopis

## 1. OSOBNI PODACI

| | |
|---|---|
| Ime i prezime: | Ena Koščec |
| Datum i mjesto rođenja: | 05.06.1996., Zagreb |
| Email: | ekoscec@gmail.com |

## 2. OBRAZOVANJE

| | |
|---|---|
| 2018. – 2021. | Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet<br>Diplomski studij, smjer Biljne znanosti |
| 2015. – 2018. | Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet,<br>Preddiplomski studij, smjer Hortikultura |
| 2011. – 2015. | XI. gimnazija, Zagreb |

## 3. STRUČNA PRAKSA

| | |
|---|---|
| ljeto 2020. | Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku,<br>Agronomski fakultet |
| veljača 2018. – travanj 2018. | OPG Luka Trogrlić, Kolodvorska ulica, Zaprešić |
| svibanj 2017. – rujan 2017. | Zavod za povrćarstvo, Agronomski fakultet |
| ožujak 2017. – listopad 2017. | Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo, Pokušalište Jazbina |

**4. STRANI JEZIK** Engleski jezik (B2), Talijanski jezik

**5. VOZAČKA DOZVOLA** B-kategorija