

Formiranje meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta za mikropropagaciju jabuke sorte Gala

Sinjeri, Lovro

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:590269>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



FORMIRANJE MERISTEMATSKOG TKIVA VISOKOG REGENERACIJSKOG KAPACITETA ZA MIKROPROPAGACIJU JABUKE SORTE GALA

DIPLOMSKI RAD

Lovro Sinjeri

Zagreb, rujan, 2022.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Biljne znanosti

FORMIRANJE MERISTEMATSKOG TKIVA VISOKOG REGENERACIJSKOG KAPACITETA ZA MIKROPROPAGACIJU JABUKE SORTE GALA

DIPLOMSKI RAD

Lovro Sinjeri

Mentor:

izv.prof.dr.sc. Anita Bošnjak Mihovilović

Zagreb, rujan, 2022.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Lovro Sinjeri**, JMBAG 0178110505, rođen 10.07.1997. u Sisku, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

FORMIRANJE MERISTEMATSKOG TKIVA VISOKOG REGENERACIJSKOG KAPACITETA ZA MIKROPROPAGACIJU JABUKE SORTE GALA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam 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 upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Lovro Sinjeri**, JMBAG 0178110505, naslova

FORMIRANJE MERISTEMATSKOG TKIVA VISOKOG REGENERACIJSKOG KAPACITETA ZA MIKROPROPAGACIJU JABUKE SORTE GALA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

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

Zahvala

Ovim se putem zahvaljujem cijeloj svojoj obitelji, djevojci i prijateljima na potpori u ustrajnosti u pisanju ovog rada, izv.prof.dr.sc. Habuš Jerčić na pomoći, lijepim riječima i susretljivosti te izv.prof.dr.sc. Bošnjak Mihovilović na volji, strpljenju i upornosti u radu sa mnom.

Hvala Vam!

„Nemo doctus nascitur.“

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1	Hipoteza i cilj istraživanja.....	2
2.	Pregled literature	3
2.1	Podrijetlo i klasifikacija	3
2.2	Uzgoj jabuke u svijetu i u Hrvatskoj.....	3
2.3	Kemijski sastav i nutritivna vrijednost ploda.....	4
2.4	Kultura tkiva	5
2.5	Mikropropagacija	6
2.6	Mikropropagacija jabuke	7
2.7	Meristematsko tkivo visokog regeneracijskog kapaciteta.....	9
3.	Materijali i metode	10
3.1	Sterilizacija pribora	10
3.2	Priprema hranidbenih medija	10
3.3	Formiranje meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta.....	11
3.4	Aksilarno grananje vršnih izdanaka jabuke	12
3.5	Aksilarno grananje horizontalno postavljenih izdanaka jabuke.....	12
3.6	Uvjeti u komori rasta.....	12
3.7	Prikupljanje i analiza dostupnih podataka.....	13
4.	Rezultati i rasprava.....	14
4.1	Izdanci formirani na meristematskom tkivu visokog regeneracijskog kapaciteta	14
4.2	Uspješnost formiranja izdanaka na meristematskom tkivu visokog regeneracijskog potencijala jabuke sorte Gala ovisno o dodanom citokininu	14
4.3	Uspješnost aksilarnog grananja vršnih izdanaka jabuke sorte Gala.....	18
4.4	Uspješnost aksilarnog grananja horizontalno postavljenih izdanaka jabuke sorte Gala	19
4.5	Usporedba uspješnosti regeneracije izdanaka klasičnom metodom aksilarnog grananja i formiranjem meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta	20
5.	Zaključak.....	21
6.	Popis literature.....	22
7.	Životopis.....	24

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Lovre Sinjerija**, naslova

FORMIRANJE MERISTEMATSKOG TKIVA VISOKOG REGENERACIJSKOG KAPACITETA ZA MIKROPROPAGACIJU JABUKE SORTE GALA

Jabuka je ekonomski važna kultura u svijetu te predmet brojnih istraživanja. Postupak stvaranja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala repliciran je na jabuci Gala te je tkivo uzgajano na identičnim hranjivim podlogama uz iznimku citokinina te smo dobili dvije grupe na kojima su provedena mjerenja, sistematizirani rezultati te izveden zaključak njihova djelovanja.

Ključne riječi: mikropropagacija, jabuka, meristematsko tkivo

Summary

Of the master's thesis – student **Lovro Sinjeri**, entitled

MICROPROPAGATION OF GALA APPLE VARIETY TROUGH FORMATION OF MERISTEMIC BULK TISSUE

Apple is an economically important culture and is the subject of numerous research. The process of production of meristemic bulk tissue was replicated on the apple Gala, the tissue was cultivated on identical mediums with the exception of cytokines out of we received two groups where measurements were carried out, results systematized and conclusion of their effect was made.

Keywords: micropropagation, apple, meristemic bulk tissue

1. Uvod

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) je ekonomski važna voćna kultura. Pripada porodici Rosaceae redu Rosales te razredu Magnoliopsida. Osim kultivirane jabuke, razlikujemo i divlje srodnike jabuci kao *Malus sieversii* te *Malus sylvestris*. Svoje podrijetlo jabuka nalazi u centralnoj Aziji odakle se dalje širila svijetom. Jabuka je izrazito stranooplodna kultura te se u proizvodnji razmnožava cijepljenjem na odgovarajuću podlogu. Prema Bhatti i Jha (2010.), do sada je kultivirano preko 7500 sorata jabuke koje se razlikuju po veličini, obliku, boji, tvrdoći, teksturi, kiselosti, slatkoći, sočnosti i samim nutritivnim vrijednostima ploda.

Jabuka se po prvi puta počela koristiti u kulturi biljnog tkiva krajem 60-ih i početkom 70-ih godina prošlog stoljeća. Raznim se istraživanjima nastojalo poboljšati rast i razvoj jabuke u *in vitro* uvjetima te se na tome i danas, više od 50 godina kasnije, intenzivno radi. Tehnika mikropropagacije je izrazito korisna metoda koja omogućuje brz i relativno jeftin način razmnožavanja novih genotipova, skraćivanja ili dovršavanja postupaka selekcije i oplemenjivanja, održavanja postojećih zanimljivih ili korisnih genotipova za kasnije potrebe te, u konačnici, daje nam mogućnost regeneracije dijelova ili cijelih biljaka u genetičkom inženjeringu. Riječ je o vegetativnom načinu razmnožavanja na umjetno stvorenoj hranidbenoj podlozi u aseptičnim uvjetima *in vitro* u kontroliranim uvjetima uzgoja koji se mogu prilagoditi optimalnoj dinamici rasta i razvoja pojedine kulture. Kloniranje biljaka metodom mikropropagacije zahtjevno je te iziskuje viši stupanj poznavanja fiziologije bilja, kemijske dinamike biljne stanice i same biljke kao cjeline, ali je isto tako i iznimno efektivna metoda vegetativnog razmnožavanja za poboljšanje kvalitete i količine prinosa, uvjeta uzgoja te dobivanje zdravih i bezvirusnih presadnica (Morrison i sur. 2000.).

Protokol za stvaranjem meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta na vinovoj lozi objavio je Mezzetti 2002. godine. Temelji se na postavljanju kulture na medij do stvaranja meristemskog tkiva nakon čega se iz njega razvijaju adventivni pupovi. U ponavljajućim se supkultivacijama postepeno povećava koncentracija BAP-a te se mehanički sprječava apikalna dominacija u svrhu stvaranja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala koje se potom održava i supkultivira na mediju s visokom koncentracijom BAP-a te stvara veći broj adventivnih pupova. Ti se isti pupovi supkultiviraju na hranjivu podlogu sa smanjenom koncentracijom citoknina i pri tome dolazi do regeneracije i izduživanja izdanaka iz adventivnih pupova (Mezzetti i sur. 2002.). Iako se smatra prikladnim za mikropropagaciju, stopa umnožavanja koju je moguće postići formiranjem ovakvog tkiva nije ispitana. Stoga se ovim istraživanjem nastojalo postići formiranje meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta na jabuci sorte Gala te je stopa multiplikacije postignuta takvim načinom mikropropagacije uspoređena sa stopom mikropropagacije postignute metodom aksilarnog grananja.

1.1 Hipoteza i cilj istraživanja

Hipoteza ovog rada je da će stopa umnožavanja izdanaka jabuke sorte Gala mikropropagiranih formiranjem meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta biti uspješnija od metode aksilarnog grananja. Krajnji je cilj utvrditi navedenu razliku u rastu i razvoju pri simultanom uzgoju izdanaka istog genotipa sorte Gala koristeći dva različita citokinina u sadržaju hranjivih podloga; tidiazuron (TDZ) i 6-benzilaminopurin (BAP).

Ciljevi rada su:

- formiranje tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta kod jabuke sorte Gala
- utvrditi razliku u stopi multiplikacije te veličini izdanaka pri uzgoju izdanaka jabuke sorte Gala regeneracijom izdanaka iz formiranog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta i mikropropagacije metodom aksilarnog grananja
- utvrditi stopu uspješnosti multiplikacije na formiranom meristematskom tkivu ovisno o korištenim citokininima u sadržaju hranjivih podloga; tidiazuronu (TDZ) i 6-benzilaminopurinu

2. Pregled literature

2.1 Podrijetlo i klasifikacija

Jabuka (lat. *Malus*) pripada biljkama reda *Rosales* porodice *Rosaceae* roda *Malus*. Listopadno je drvo čije udomaćene sorte rastu od 1,8 do 4,6 m dok divlje sorte mogu dostići i do 12 m. Cvjeta u proljeće pri čemu iz pupoljaka simultano izbijaju i listovi. Cvjetovi su veličine 3 do 5 cm, bijeli s blagim ružičastim nijansama koje postepeno nestaju, pentamerni (pet latica), a grupirani su u cvatove od 4 do 6 cvjetova. Središnji cvijet u cvatu naziva se još i kraljevski cvijet jer se otvara prvi i može se razviti u signifikantno veći plod u usporedbi s ostalim cvjetovima cvata (Janick i sur. 1996.). Plodovi sazrijevaju u kasno ljeto ili ranu jesen, uz veliki broj sorti u širokom rasponu različitih veličina ploda. Koža ploda je najčešće crvena, žuta, zelena, ružičasta ili smeđa, iako postoje brojne sorte s dvobojnim ili trobojnim plodovima. Koža ploda je prekrivena epikutikularnom smolom u svrhu zaštite ploda od vanjskih utjecaja te sprječava evaporaciju vode iz mesa ploda (Kolattukudy 1948.). Meso ploda je na svježem presjeku obično svijetlo žute ili bijele boje, a poznati su varijeteti sa ružičastim i žutim mesom (Janick i sur. 1996.).

Jabuka, najkultiviranije drvo na svijetu, samoniklo je rasla na području Europi u pretpovijesno doba. Pitoma jabuka porijeklom je iz južnog Sibira i Azije, a Grci i Rimljani uzgajali su različite sorte (Cornille i sur. 2012.). Istočna Turska i Kavkaz čine središte raznolikosti roda *Malus*. Jabuka je tamo prvotno i uzgajana, odakle se proširila po Europi. Aleksandar Veliki jednu je vrstu jabuke pronašao u Maloj Aziji oko 300. godine pr. Kr, te ponio u Grčku. Karlo Veliki naredio je sadnju jabuka u njemačkim zemljama oko 800. g., a oko 1600. g. već je bilo poznato gotovo 200 sorti jabuke. Engleski kolonizatori su je 1600. g. prenijeli u Sjevernu, a potom i u Južnu Ameriku. Kroz tisuće godina uzgoja jabuka je dobila svojstva koja poznajemo danas, pa predstavlja najrasprostranjeniju voćnu vrstu na svijetu (Cornille i sur. 2012.).

2.2 Uzgoj jabuke u svijetu i u Hrvatskoj

Ukupna svjetska proizvodnja jabuka prema podacima FAOSTAT-a u 2020. godini bila je 86 440 000 t, te je nakon banane i lubenice, treće voće po „proizvedenoj“ količini u svijetu. Najveći svjetski proizvođač je Kina sa 45 500,000 t, a zatim slijede USA, Turska i Indija. Opaža se pad količina površine pod nasadima jabuka, ali zbog povećanog prinosa po jedinici površine zahvaljujući znanosti, količina ukupnih prinosa je u porastu (FAOSTAT 2022.). Prema podacima Državnog zavoda za statistiku u RH je 2017. bilo prijavljeno 5.944 ha pod uzgojem jabuka. Ukupna proizvodnja je iznosila 56 570 t, od čega je 55 790 t intenzivna proizvodnja za tržište, a ostatak ekstenzivna, pretežno za vlastite potrebe na ukupno 5.756 ha. Hrvatski sortiment jabuke svodi se na mali broj sorata od kojih prvo mjesto zauzima sorta Idared, a prati ga Golden Delicious (Pinova 2022.). Uz te dvije sorte, u manjoj mjeri uzgaja se Jonagold i njegovi mutanti, Granny Smith te mutanti sorte skupine Gala (Pinova 2022.).

Grupu Gala čine trenutno najpoznatije sorte Gala Must-Regal Prince, Galaxy, Mondial Gala-Mitchgla, Delbard Gala-Obrogala-Ultra Red Gala, Royal Gala-Tenroy (Slika 2.2.1), Ruby Gala, Brookfield-Baigent i Schnitzer-Schniga (University of Reading 2019.). Gala je sorta stvorena na Novom Zelandu križanjem Kidd's Orange Red x Golden Delicious. Počela se intenzivno uzgajati 1962. godine, ali nije postala popularna do 1972. godine. Gala je stranooplodna sorta. Po karakteristikama rasta je slična Golden Deliciousu. Osjetljiva je na fuzikladij. Dosta je otporna na niske zimske temperature. Dobro je oprašuju Elstar, Crveni Delišeš, Fuji, Zlatni Delišeš i Granny Smith. Ima plod koji je srednje krupan, okrugao i čvrst. Meso je hrskavo, fine teksture, slatko i aromatično. Pokožica je žute boje s narančasto crvenom dopunskom bojom u standardnog tipa, a u nekih klonova s tamnijom crvenom bojom. Nedostatak ove sorte je veliki broj slabo obojenih plodova, a javlja se i pucanje plodova u peteljkinom udubljenju (Svetozarević 2018.).



*Slika 2.2.1 Plod i presjek ploda jabuke sorte Royal Gala
(izvor: biosuedtirol.com)*

2.3 Kemijski sastav i nutritivna vrijednost ploda

Plod jabuke bogat je hranjivim sastojcima čija količina ovisi o vrsti te o načinu uzgoja, a gotovo svi potrebni nutrijenti prisutni su barem u minimalnim količinama (Crkvenac 2019.). Prosječno, voda čini 82% težine ploda, ugljikohidrata ima oko 12%, masti i bjelančevina zajedno oko 1%, a celuloza se nalazi u plodu u količini od oko 1% (Crkvenac 2019.). Osim osnovnih tvari, jabuka sadrži i niz drugih sastojaka neophodnih za ljudski organizam: šećer (glukoza, fruktoza i saharoza), netopljiva vlakna (pektin), organske kiseline (omjer šećera i kiselina određuje slatkoću), sve esencijalne i neesencijalne aminokiseline (ali u vrlo malim količinama), aromatične tvari, boje (klorofil, karoteonidi i antocijani), vitamine i minerale (osobito ima dosta kalija), pa čak i masnoće (sjemenke sadrže 24% ulja). Jabuka sadrži 3,3 g dijetalnih vlakana – više od 10% dnevne količine vlakana koju preporučuju stručnjaci za prehranu (Cuthbertson i sur. 2012.; Vrhovsek i sur. 2004.).

2.4 Kultura tkiva

Postupci *in vitro* kulture mogu biti primijenjeni u raznim biotehnološkim postupcima s ciljem očuvanja i zaštite genetskog materijala neke ugrožene vrste, razmnožavanja genetički superiornijih kultivara koji mogu biti otporniji na stres, pokazati veću otpornost prema određenim pesticidima i/ili herbicidima i sl. pa čak i razviti biljke kojima će se namjerno izmijeniti njen genotip. *In vitro* kultura je svestrano oruđe moderne genetike i svakog oplemenjivača u cilju istraživanja dinamike rasta i razvoja raznih kultivara te njihovih biokemijskih i fizioloških karakteristika (Međedović i Ferhatović 2003.).

In vitro tehnike se mogu sistematizirati ovisno o vrsti eksplantata koji se uvodi u kulturu (stanice, biljni organi ili tkiva) te je moguća podjela po namjeni (proizvodnja haploida, somatska embriogeneza, itd.) (Vinterhalter i Vinterhalter 1996). Kada se govori o vrsti eksplantata, razlikujemo protokole za pojedine biljne organe, tkiva i stanice koji nose nazive po dijelu biljke od kojeg se razvija početna populacija stoga imamo kulturu cijelih biljaka, kulturu embrija, kulturu antera, kulturu meristema, kulturu apikalnog i aksilarnog pupa te kulturu pojedinačnih nodija.

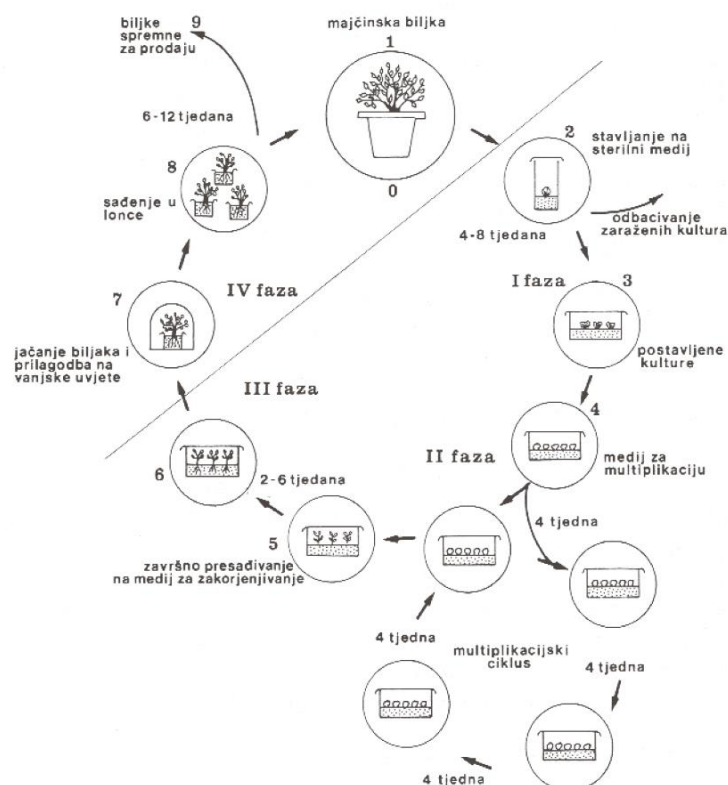
Prethodno je rečeno da se *in vitro* postupcima može promijeniti genotip no uzme li se eksplantat, primjerice, vršnog meristema izdanka korijena, taj će izdanak slijediti svoj razvojni proces i diferencijaciju novonastalih stanica voditi u smjeru daljnjeg stvaranja korijena tj. u smjeru koji mu je genetski predeterminiran. Takav rast naziva se organizirani rast. Kako bi se moglo manipulirati biljnim stanicama, procese proliferacije koji će biti bez diferencijacije se mora usmjeriti prema stvaranju neorganiziranih staničnih struktura, kalusa. Takav se rast naziva neorganizirani te se javlja kod eksplantata koji ne sadrže poznate strukture biljnog organizma ili imaju ograničen broj različito diferenciranih stanica (Međedović i Ferhatović 2003.). Kultura tkiva, kao i kultura stanica u suspenziji, kultura polena i kultura protoplasta se bazira na neorganiziranom rastu te ono sadrži veliki potencijal za stvaranje istraživanja.

Nakon prvotnih istraživanja, znanstvenici su uvidjeli da korištenje kalusa u *in vitro* tehnikama zna rezultirati pojavom aberantnih biljaka što, u rasadničarskoj proizvodnji koja teži umnažanju biljnog materijala onako kakav je on prvotno bio, nije poželjno. Početkom 80-ih godina prošlog stoljeća su Larkin i Scowcroft (Vinterhalter i Vinterhalter 1996.) shvatili da se te promjene (tj. varijabilnosti) mogu pokazati korisnoma u selekciji i oplemenjivanju za poželjna svojstva. Tako je nastao termin „somaklonska varijabilnost“ koji se odnosi na promjene genotipa koje su izazvane u *in vitro* kulturi i postaju nasljedne. Metode *in vitro* tehnika mogu izazvati i fenotipske, epigenetske promjene koje su prolazne i nepoželjne u klonskom razmnožavanju jer iziskuju detaljno traženje uzroka svog nastanka (Vinterhalter i Vinterhalter 1996.). Uz pojavu somaklonske varijabilnosti, drvenaste su kulture općenito zahtjevnije za kultivaciju u *in vitro* uzgoju naspram zeljastih kultura iz nekoliko razloga. Drvenaste kulture imaju zamjetno slabiju regeneracijsku moć u usporedbi sa zeljastim biljkama, podložnije su izlučivanju različitih toksina (npr. tanina) u hranjivu podlogu te njihova stopa replikacije, koja je podosta bitna za uspješnost *in vitro* tehnika, je također dosta niža naspram zeljastih biljaka što se može povezati s činjenicom da se kod drvenastih kultura radi o višegodišnjim kulturama, a ne jednogodišnjim (Jelaska 1994.).

2.5 Mikropropagacija

Mikropropagacija je metoda ubrzanog razmnožavanja uzgajanjem različitih somatskih stanica, tkiva ili biljnih organa na umjetnoj hranidbenoj podlozi u *in vitro* uvjetima, pod kontroliranim uvjetima uzgoja, a bazira se na totipotentnosti – jedinstvenom svojstvu biljke da se iz jednog dijela biljke (pupa, meristema, biljnog tkiva, jedne biljne stanice) razvije cijela zdrava i potpuno funkcionalna biljka (Jelaska 1994., Pavlina 1994). Može se reći da je to proces kloniranja jer sve proizvedene biljke predstavljaju kopije razmnoženog „majčinskog“ uzorka. Riječ je o iznimno perspektivnoj tehnologiji kojom se rješavaju čak dva problema tradicionalne proizvodnje. Mikropropagacijom se dobiva visoka stopa multiplikacije od 10^6 - 10^8 biljaka po samo jednom eksplantatu godišnje, a biljke dobivene na taj način su oslobođene virusa, bakterija i gljivica što je savršena predispozicija za dobivanje uroda povećane kvalitete i kvantitete (Pavlina 1994.). Također, nije ograničena na jedan period u godini već se mikropropagacija može vršiti tokom cijele godine. Biljke nastale tom metodom su potpuno zdrave (ako se krene od bezvirusnih majčinskih biljaka) te na taj način možemo umnažati biljke koje ne stvaraju dovoljnu količinu sjemena da bi bile isplative u komercijalnoj upotrebi ili su pak sterilne pa ne mogu uopće stvarati daljnje potomstvo (Dobránszki i da Silva 2010.) Može se reći da je to proces kloniranja jer sve proizvedene biljke predstavljaju kopije razmnoženog „majčinskog“ uzorka.

Postupak mikropropagacije se sastoji od nekoliko faza. Prvo se s majčinske biljke, biljke koju želimo multiplicirati, uzima biljni materijal koji je prije uvođenja u kulturu potrebno sterilizirati u svrhu izbjegavanja mogućnosti kontaminacije. Sljedeća je faza multiplikacije u kojoj se kroz multiplikacijski ciklus nastoji povećati broj jedinki uz zadržavanje genetske stabilnosti materijala. Kada je dobivena zadovoljavajuća količina materijala, novo dobivene biljke se stavljaju na medij za zakorjenjivanje kako bi se zaustavilo stvaranja aksilarnih izdanaka te stimulirao početak izduživanja izdanaka i potaknulo stvaranja korijena. Posljednji je korak prenošenje biljaka u zemlju u svrhu aklimatizacije na rast i razvoj u vanjskim uvjetima (samostalna opskrba mikro i makro nutrijentima iz zemlje, vršenje fotosinteze u svrhu opskrbe potrebnim šećerom) (Slika 2.5.1).



Slika 2.5.1 Dijagramski prikaz postupka mikropropagacije
(Marković i sur., 2011.)

2.6 Mikropropagacija jabuke

Krajem 60-ih godina 20. stoljeća započinju prva istraživanja vezana za mikropropagaciju jabuke. S vremenom su se počeli kultivirati razni genotipovi jabuke na čiju su temu do danas objavljeni brojni radovi koji su se fokusirali na različite aspekte mikropropagacije pojedinih sorata. U kombinaciji s eliminacijom virusa putem termoterapije i kulture meristema, mikropropagacija je tako dala rješenje rasadničkoj proizvodnji. Prvi rezultati bili su zadovoljavajući jer su pokazali da biljke proizvedene kulturom meristema i pupova u potpunosti zadržavaju svoja klonska svojstva i da se ne razlikuju od biljaka proizvedenih klasičnim postupcima. Također, objavljeni su brojni radovi za razne, posebice voćne vrste, koji dokazuju da su po nizu parametara koji definiraju kvalitetu sadnica i plodova, biljke iz epruvete superiornije nad biljkama proizvedenim konvencionalnim putem (Pintarić 2008.).

Na temelju dugogodišnjih istraživanja i komercijalnih potreba, razvijene su pouzdane metode mikropropagacije promatranjem interakcija između podloge i biljke (Dobránszki i da Silva 2010.).

Proces mikropropagacije započinje odabirom eksplantata za *in vitro* uzgoj. Za jabuku se pokazalo da su idealni eksplantati aksilarnih pupova duljine 0.2-0.6 cm. Kraći pupovi u usporedbi s dužima (0.6-2 cm) imaju 60% veću mogućnost da prežive te pokazuju veću otpornost na nekrozu (Pan i van Staden, 1998.). Eksplantati se moraju sterilizirati kako bi se što

više smanjila mogućnost kontaminacije unošenjem stranih mikroorganizama te kako bi biljke bolje i brže napredovale u rastu i razvoju. Kod jabuke je ovo važan korak jer jedan način sterilizacije neće odgovarati svim genotipovima jabuke te neće jednako inhibirati smeđenje izazivano fenolima. Smeđenje eksplantata je posljedica aktivacije obrambenog mehanizma jabuke na fizičko oštećenje koje aktiviraju polifenolne oksidaze (PPO) i peroksidaze (POX) (Pan i van Staden, 1998.).

Sljedeći je korak multiplikacija prvotnog biljnog materijala. Cilj je potaknuti razvoj *in vitro* izdanaka sposobnih za daljnje cikluse razmnožavanja (supkultiviranje) ili da ih se pripremi za ukorjenjivanje. Uspješnost multiplikacije ovisi o mnoštvu faktora kao što su biljna vrsta na kojoj se radi, sorti, konzistenciji medija, koncentraciji hranjiva, vitamina i/ili minerala, regulatorima rasta, temperaturi, pH podloge, izloženosti i vrsti svjetla, vlazi itd. (Jelaska 1994.). Najčešće korišten medij na kojem se jabuka multiplicira u kulturi tkiva je Murashige and Skooge (MS) medij. Naravno, postoje istraživanja i radovi o uzgoju i na drugim medijima, ali po Welanderovu istraživanju (1985.) MS se pokazao kao najučinkovitiji za uzgoj *in vitro* izdanaka dužih od 1 cm. U MS mediju se nalaze makro i mikroelementi, vitamini, izvor ugljika (saharoza), mioinozitol te, također važni, regulatori rasta. Rast samih izdanaka ovisi o stanju aksilarnih pupovai čija je aktivnost regulirana regulatorima rasta. U slučaju jabuke, za aksilarni rast je najviše reguliran citokininima uz niske koncentracije auksina. BAP ili 6-benzilaminopurin je najčešće korišten citokinin na jabuci, dok su IBA (indolin-3-maslačna kiselina) i IAA (indolil-3-ocetna kiselina) najčešći auksini (Bhatti i Jha 2010). Istraživanje koje su proveli Ma i sur. (1998) je pokazalo da korištenje etilenskih inhibitora (AgNO_3 , AVG, CoCl_2) na sorti jabuke Royale Gala može dovesti do pojačanog rasta korijena te potaknuti razvoj korijena dok su tretmani etilenskim prekursorima (ACC) produljili vrijeme razvoja korijena i smanjili njegovu površinu. Na taj bi se način etilenskim inhibitorima mogao ubrzati i poboljšati proces *in vitro* zakorjenjivanja jabuke, no potrebno je još istražiti kako ti inhibitori djeluju na druge sorte jabuke (Dobránszki i da Silva 2010.). Nakon multiplikacije slijedi zakorjenjivanje biljaka te njihova aklimatizacija u prirodnim uvjetima.

V. R. Bommineni i sur. su 2001. godine raznim tretmanima htjeli poboljšati proces klonske *in vitro* propagacije na jabuci i krušci. Istraživanje je provedeno na jabuci sorte Gala te na krušci sorte Bartlett. Jabuka je uzgajana iz komadića stabljike na MS mediju te su biljke podijeljene u dvije skupine. Prva grupa je odmah bila u komori rasta pod hladno-bijelim fluorescentnim svjetlom s fotoperiodom 16/8 sati, dok je druga grupa bila izložena tami prva 2 tjedna te je naknadno uvedena u iste uvjete kao prva grupa. Nakon što su dobiveni izdanci pomoću kojih će se dobiti veća *in vitro* populacija, napravljena je podjela na temelju korištenih regulatora rasta iz skupine citokinina. U mediju jedne skupine je korišten BAP, a u drugoj TDZ (tidiazuron). Rezultati istraživanja su pokazali da je frekvencija stvaranja izdanaka povećana za 17% do 38% za sve biljke koje su bile prvotno 2 tjedna u tami u odnosu na biljke koje su od početka bile na svjetlom. Prosječni broj novonastalih izdanaka je varirao, a pokazao se najveći u grupi biljaka tretiranih BAP-om koje nisu bile izložene tami te grupi koja je bila tretirana TDZ-om i koje su prvotno bile u tami. Statistički gledano, na kraju nisu uočene signifikantne razlike između korištenih regulatora rasta (Bommineni i sur. 2001.).

2.7 Meristematsko tkivo visokog regeneracijskog kapaciteta

Metoda meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta (*eng.* meristemic bulk tissue; MBT) je metoda koja ima visok regeneracijski kapacitet i može se provesti na adventivnim izdancima. U istraživanju na vinovoj lozi koje su proveli Preiner i sur. (2018.) je tom metodom dobivena biljka kimera vinove loze između sorte Cabernet sauvignon i Babić. Skupljeni su eksplantati s 3-4 dormantna pupa pojedinih sorata te stavljeni u komoru rasta dok ne krenu izdanci. Zatim je od izdanaka uspostavljena *in vitro* kultura na Chee and Pool (CP) mediju na kojem su se prilikom svake supkultivacije mijenjale tj. postepeno povećavale doze citokinina BAP (6-benzilaminourin). Meristemsko tkivo se u potpunosti razvilo tokom 2-3 subkultivacije na CP mediju u fazi najveće koncentracije BAP-a (Preiner i sur. 2018.). Provedeno istraživanje temeljeno je na saznanjima Mezzettija i sur. iz 2002. godine. Mezzetti i sur. su korištenjem metode meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta uzgajali dvije sorte vinove loze, Silcoru i Thompson Seedless. Tim su procesom dobili meristemsko tkivo koje je zapravo nakupina stanica s visokim regeneracijskim kapacitetom. Proces se sastojao od četiri supkultivacije proliferirajućih izdanaka kemijskim i mehaničkim tretmanima. U prvoj fazi se uklanja apikalni pup u svrhu sprječavanja apikalne dominacije te poticanja rasta aksilarnih pupova, a izdanci su na MS mediju u kojem je varijabilna komponenta citokinin benzil adenin (BA) kojeg je prvotno stavljeno 4.4 μM . U drugoj fazi je izdancima nakon 30 dana ponovno uklonjen apikalni pup te su izdanci vraćeni ponovno na MS medij, ali sada s 8.8 μM BA. U trećoj i četvrtoj subkultivaciji se isto uklanja apikalni pup nakon 60 i 90 dana te se količina BA poveća na 13.2 μM . Na takvom se mediju može stvarati meristemsko tkivo tokom duljeg perioda uz kontinuirano stvaranje adventivnih izdanaka. U unutrašnjosti meristemskog tkiva je zapažena hipertrofija parenhimskih stanica s vrlo vaskulariziranim trakama te kvržice iz kojih nastaju adventivni pupovi (Mezzettija i sur. 2002.). Takvo se meristemsko tkivo može vrlo jednostavno propagirati jer se svaki fragment tog tkiva može odvojiti i iz svakog se tog fragmenta može dobiti novo meristemsko tkivo nakon samo 3-4 tjedna kultiviranja. Ti fragmenti su izuzetno korisni kao početni materijal u vegetativnoj propagaciji te za provođenje genetskih transformacija.

3. Materijali i metode

U laboratorijskom istraživanju su korišteni izdanci jabuke (*Malus domestica* Borkh.) sorte Gala uzgajani u kulturi tkiva u Biotehnološkom laboratoriju Zavoda za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku Agronomskog fakulteta u Zagrebu.

3.1 Sterilizacija pribora

Kako bi se izbjegle komplikacije kontaminacije eksplantata, važno je temeljito dekontaminirati i sterilizirati uzorke, ali i sva sredstva za rad – laminar, pribor, laboratorijsko suđe. Eksplantati postavljeni u kulturu se uzgajaju u komorama rasta na hranjivim podlogama koje mikroorganizmima daju savršene uvjete za život. Mikroorganizmi mogu dovesti eksplantat do stanja totalne kontaminacije kako se oboje nalaze u kompeticiji za hranjiva koja su im potrebna za rast i razvoj. Primjerice, plijesni i određenim gljivicama su uvjeti u komori rasta idealni; imaju izvor hraniva u obliku šećera za rast i preživljavanje, dovoljno mikro i makroelemenata, optimalnu vlagu te pravilnu izmjenu dana i noći.

Prije početka rada na uzgojenoj kulturi, laminar se mora upaliti minimalno 30 minuta prije otvaranja i vađenja uzoraka u njemu, podloga za rad se višestruko briše 70%-tnim alkoholom nakon čega se pali integrirana UV lampa na minimalno 30 minuta kako bi uništilo što više preostalih mikroorganizama na radnoj površini. Sav pribor koji se donosi u laminar i koristi u kulturi tkiva se mora autoklavirati te se svi koraci istraživanja, osim pripreme medija, moraju provoditi u laminaru kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka. U laminaru tijekom rada gori plinski plamenik u svrhu sterilizacije korištenog pribora između pojedinog eksplantata. Od pribora u propagaciji korištene su titanijske pincete, skalpeli, sterilne Petrijeve zdjelice te sterilne Magenta posude (posude u koje se ulijeva prethodno pripremljeni medij na koji se postavlja kultura te stavljaju novonastali izdanci tokom propagacije). Petrijeve zdjelice služe kao podlošci za rezanje i obradu eksplantata te moraju biti prije bilo kakvih radnji s eksplantatom potpuno sterilizirane te se koriste po pravilu „Jedan eksplantat – jedna Petrijeva zdjelica.“ One se zajedno sa svim ostalim priborom autoklaviraju prije svakog korištenja na 121 °C uz primjenu tlaka od 103 421 Pa u periodu od 25 minuta te se otvaraju iz svojih posuda tek u laminaru.

3.2 Priprema hranidbenih medija

U praksi se koriste različite formulacije medija s različitim omjerima vitamina, minerala i fitohormona koji su prilagođeni pojedinoj vrsti. Za razvoj meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta je korišten MS (Murashige i Skoog medij) medij s različitim koncentracijama BAP i TDZ. Sastav hranidbenog medija te različite koncentracije regulatora rasta se nalaze u Tablici 3.2.1. U čašu su prvo pipetirane potrebne količine makro i mikro elemenata, MS vitamina, izvora željeza i hormona rasta. Nakon toga su odvagani kruti sastojci,

što uključuje, saharozu, inozitol i hidrolizirani kazein i dodani u čašu. Čaša sa svim sastojcima je stavljena na elektromagnetsku mješalicu kako bi se otopili kruti sastojci. Hranidbeni medij je namješten na pH 5,8 uz pomoć pH metra dodavanjem kap po kap HCl-a i/ili NaOH. Agar je nakon vaganja stavljen direktno u laboratorijsku staklenu bocu za autoklaviranje. Medij je steriliziran u autoklavu na temperaturi od 121 °C, pri tlaku od 1 bara i trajanju od 25 minuta. Nakon sterilizacije medij je izlijevan u laminaru u sterilne Magenta posude (Magenta™ vessel GA-7, Sigma-Aldrich, Njemačka).

Tablica 3.2.1 Sastav hranidbenih medija korištenih u istraživanju

Tretman	Sastav
MSD1	MS soli i vitamini, inozitol 0.1 g L ⁻¹ , saharoza 30 g L ⁻¹ , prolin 100 mg L ⁻¹ , BAP 2 mg L ⁻¹ , IAA 0,1 mg L ⁻¹ , Plant agar 7 g L ⁻¹ ; pH 5.8
MSD2	MS soli i vitamini, inozitol 0.1 g L ⁻¹ , saharoza 30 g L ⁻¹ , prolin 100 mg L ⁻¹ , BAP 3 mg L ⁻¹ , IAA 0,1 mg L ⁻¹ , Plant agar 7 g L ⁻¹ ; pH 5.8
MSD3	MS soli i vitamini, inozitol 0.1 g L ⁻¹ , saharoza 30 g L ⁻¹ , prolin 100 mg L ⁻¹ , BAP 3,5 mg L ⁻¹ , IAA 0,1 mg L ⁻¹ , Plant agar 7 g L ⁻¹ ; pH 5.8
MSD4 BAP	MS soli i vitamini, inozitol 0.1 g L ⁻¹ , saharoza 30 g L ⁻¹ , prolin 100 mg L ⁻¹ , BAP 4 mg L ⁻¹ , IAA 0,1 mg L ⁻¹ , Plant agar 7 g L ⁻¹ ; pH 5.8
MSD4 TDZ	MS soli i vitamini, inozitol 0.1 g L ⁻¹ , saharoza 30 g L ⁻¹ , prolin 100 mg L ⁻¹ , TDZ 0,5 mg L ⁻¹ , IAA 0,1 mg L ⁻¹ , Plant agar 7 g L ⁻¹ ; pH 5.8
R1	MS soli i vitamini, inozitol 0.1 g L ⁻¹ , saharoza 30 g L ⁻¹ , prolin 100 mg L ⁻¹ , BAP 1 mg L ⁻¹ , IAA 0,05 mg L ⁻¹ , Plant agar 7 g L ⁻¹ ; pH 5.8

3.3 Formiranje meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta

Svaka supkultivacija eksplantata se vrši u laminaru u maksimalno sterilnim uvjetima koristeći se svaki put isključivo sterilnim priborom u svrhu smanjenja mogućnosti kontaminacije eksplantata. Eksplantat se stavlja u Petrijevu zdjelicu te se jedino u njoj rade svi potrebni zahvati na način da se eksplantat nalazi na sredini zdjelice i niti jednim svojim dijelom ne dira rub zdjelice. Svaki kontakt s eksplantatom se vrši jedino sterilnom pincetom i skalpelom. Eksplantat se iz Magenta posude vadi pincetom. Pincetu je potrebno na plamenu sterilizirati te ju pustiti da se ohladi kako bi se mogla koristiti kasnije za stavljanje eksplantata na novi medij u novu Magenta posudu.

Postupak formiranja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta počinje postavljanjem izdanka s 2-3 nodalna segmenta, bez vršnog pupa na MSD1 podlogu. Svakih 21 - 28 dana se vrše supkultivacije pri čemu se izdanci supkultiviraju na medij s većom koncentracijom citokina od prethodnog (MSD2 – MSD3 – MSD4). U svakoj supkultivaciji

новоformiranim se izdancima oštećuje vršni pup kako bi se potaknuo razvoj novih izdanaka iz postranih nodija sve do formiranja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta.

Nakon što je razvijeno tkivo visokog regeneracijskog kapaciteta, supkultivira se na R1 medij na kojem dolazi do regeneracije izdanaka. R1 medij sadrži manju količinu citokinina da bi potaknuo razvoj i izduživanje izdanaka iz meristematskog tkiva. Broj izdanaka koji su se razvili u postupku razvoja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta je zabilježen i izmjerena je dužina svakog pojedinog izdanka. Formirana meristematska tkiva su se povećavala u veličini te su rezana na manje dijelove da zadrže veličinu do 1,5 cm u promjeru radi bolje apsorpcije hranjiva iz podloge.

Odrežani su izdanci s meristematskog tkiva supkultivirani na MSD4 medij s visokom dozom citokinina da bi se ponovno potaknulo formiranje meristema. Postojale su dvije verzije tog medija: MSD4 BAP i MSD4 TDZ (Tablica 3.2.1). Nakon supkultivacije na MSD4 BAP ili MSD4 TDZ slijedila je supkultivacija na R1 medij za izduživanje izdanaka. Ovaj postupak je ponavlján u 3 ciklusa.

3.4 Aksilarno grananje vršnih izdanaka jabuke

Vršni izdanci jabuke veličine 10 mm postavljani su na MSG medij koji se sastojao od MS soli i vitamini, inozitol 0.1 g L^{-1} , saharoza 30 g L^{-1} , prolin 100 mg L^{-1} , BAP 1 mg L^{-1} , Plant agar 7 g L^{-1} , pH 5.8.

Kroz 3 ciklusa supkultivacija vršenih svaka 4 tjedna, brojani su novonastali izdanci te je mjerena duljina svakog pojedinog izdanka pomoću milimetarskog papira postavljenog ispod Petrijeve zdjelice.

3.5 Aksilarno grananje horizontalno postavljenih izdanaka jabuke

Izdanci jabuke veličine 10 mm, odrezanog vrha i odrezanih listova, postavljani su u horizontalnom položaju na MSG medij. Kroz 4 ciklusa supkultivacija, vršenih svaka 4 tjedna brojani su novonastali izdanci te je mjerena duljina svakog pojedinog izdanka pomoću milimetarskog papira.

3.6 Uvjeti u komori rasta

Nakon postavljanja izdanaka u Magenta posude s različitim tretmanima, kulture su inkubirane u komori rasta na $23,5 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i fotoperiod od 16 sati dana i 8 sati noći. Umjetno osvjetljenje osigurano je pomoću fluorescentnih cijevi Osram L 36W/77 FLUORA dok je intenzitet svjetla iznosio $40 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

3.7 Prikupljanje i analiza dostupnih podataka

Istraživanje formiranja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta je započeto sa 4 Magenta posude, u svakoj po 4 izdanaka. Dakle, ukupno 16 izdanaka. Pri svakoj supkultivaciji bilježen je broj novoformiranih izdanaka duljine veće od 10 mm te su isti pritom odstranjivani. Eksplantat koji je u ovom slučaju bilo tkivo visokog regeneracijskog kapaciteta u nastajanju je supkultivirano na sljedeći tretman.

Istraživanje aksilarnog grananja vršnih izdanaka jabuke sorte Gala, postavljeno je u 7 Magenta posuda, u svakoj po 4 eksplantata s ukupno 28 izdanaka.

Istraživanje aksilarnog grananja horizontalno postavljenih izdanaka jabuke sorte Gala, postavljeno je u 7 Magenta posuda, u svakoj po 4 eksplantata.

Iz sva tri provedena istraživanja podaci su prikupljeni fizičkim mjerenjem te obrađeni metodama deskriptivne statistike.

4. Rezultati i rasprava

4.1 Izdanci formirani na meristematskom tkivu visokog regeneracijskog kapaciteta

Svi prikupljeni podaci kroz 6 mjeseci vršenja supkultivacija sistematizirani su i prikazani u Tablici 4.1.1. Od početnih 16 postavljenih eksplantata, kroz 3 mjeseca, u procesu formiranja meristematskog tkiva razvijeno je 446 izdanaka, odnosno 27,87 izdanaka po postavljenom eksplantatu.

Tablica 4.1.1 Vrijednosti mjerenja broja, dužine te prosječne dužine izdanaka razvijenih u procesu formiranja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta

Medij	Datum supkultivacije	Broj početnih eksplantata	Ukupan broj izdanaka	Broj razvijenih izdanaka > 10 mm po postavljenom eksplantatu
MSD1	03.06.2020	16	0	0
MSD2	24.06.2020.	16	52	3.25
MSD3	30.07.2020.	21	86	4.09
MSD4	24.08.2020.	20	103	5.15
R1	04.09.2020.	24	205	8.54
Zbroj			446	27.87

4.2 Uspješnost formiranja izdanaka na meristematskom tkivu visokog regeneracijskog potencijala jabuke sorte Gala ovisno o dodanom citokininu

Na hranjivim podlogama od MSD1 do MSD4 smo od prvotnih eksplantata kroz 3 mjeseca dobili meristematsko tkivo visokog regeneracijskog potencijala.

Kroz sljedeća 3 mjeseca, uzgojeno kalusno-meristematsko tkivo visokog regeneracijskog potencijala (bulk) je supkultivirano kroz 3 ciklusa koji su se sastojali od uzgoja kalusnog tkiva na MSD4 (Slika 4.2.1) podlozi s adekvatnim citokininom (BAP ili TDZ) te prebacivanja kalusa na R1 medij u svrhu razvoja i izduživanja izdanaka (Slika 4.2.2). Ovaj dio istraživanja započet je s 21 eksplantatom kalusno-meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala (bulk)

postavljenima na MS medij s citokininom TDZ te sa 17 bulk-ova postavljenih na medij citokininom BAP. Razvoj i izduživanje izdanaka, sistematički je praćeno za svaki tretman kako je prikazano u tablicama 4.2.1 i 4.2.2:



Slika 4.2.1 Formirano meristematsko tkivo (bulk) nakon supkultivacije na MSD4 mediju (izvor: osobna galerija)



Slika 4.2.2 Izduženi izdanci razvijeni iz meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala nakon 2 tjedna na MSR1 mediju (izvor: osobna galerija)

Tablica 4.2.1 Vrijednosti mjerenja broja, dužine te prosječne dužine izdanaka po pojedinom bulk-u uzgajanom na TDZ-u

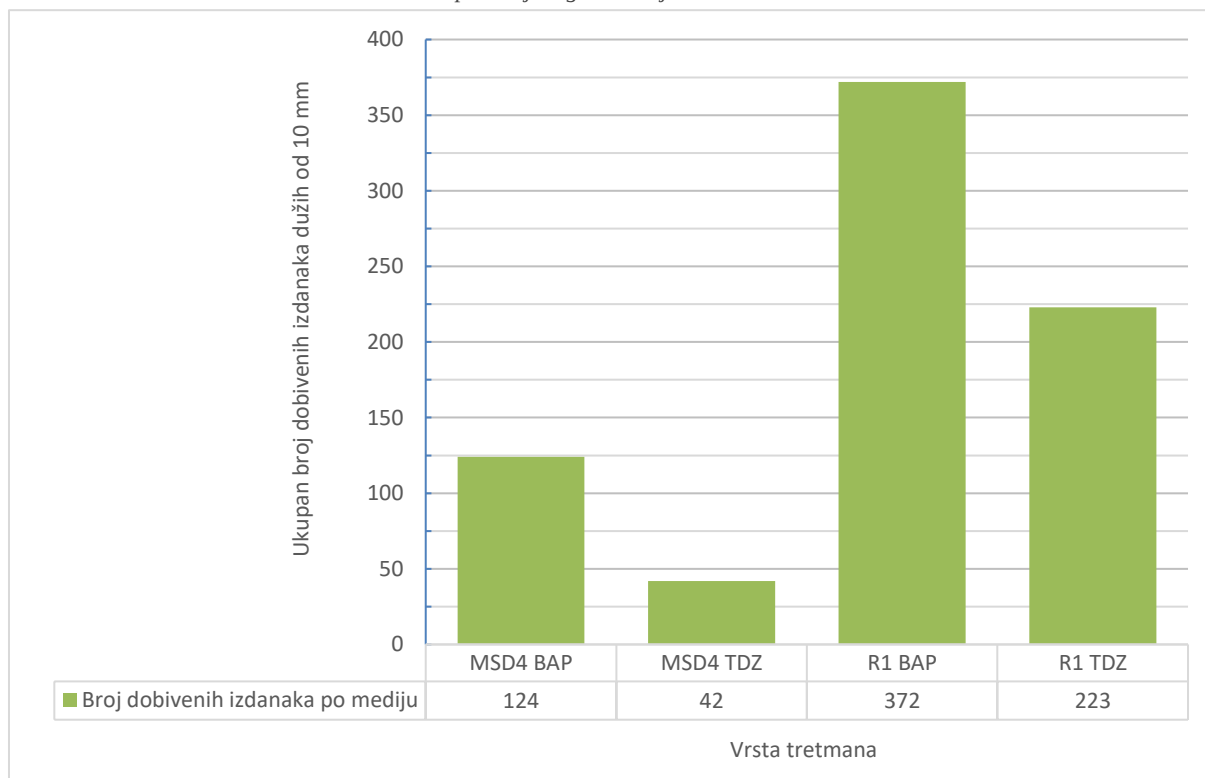
Medij	Datum supkultivacije	Broj bulkova	Ukupan broj izdanaka	Br. izdanaka po bulku > 10 mm
MSD4 TDZ	18.09.2020.	21	12	0.57
R1	09.10.2020.	20	133	6.65
MSD4 TDZ	23.10.2020	18	16	0.88
R1	17.11.2020.	20	86	4.3
MSD4 TDZ	09.12.2020.	24	14	0.58
R1	21.12.2020.	16	4	0.25
Zbroj			265	

Tablica 4.2.2 Vrijednosti mjerenja broja, dužine te prosječne dužine izdanaka po pojedinom bulk-u uzgajanom na BAP-u

Medij	Datum supkultivacije	Broj bulkova	Ukupan broj izdanaka	Br. izdanaka po bulku > 10 mm
MSD4 BAP	18.09.2020.	17	38	2.23
R1	09.10.2020.	18	190	10.55
MSD4 BAP	23.10.2020	18	25	1.38
R1	17.11.2020.	12	114	9.5
MSD4 BAP	09.12.2020.	16	61	3.8
R1	21.12.2020.	16	68	4.25
Zbroj			496	

Vršenjem paralelne supkultivacije i mjerenja izdanaka, prikupljeni su sljedeći podaci prikazani na Grafikonu 4.2.1:

Grafikon 4.2.1 Broj izdanaka dužih od 10 mm dobiven na meristematskom tkivu visokog regeneracijskog potencijala jabuke Gala postavljenog na mediju s BAP-om i TDZ-om



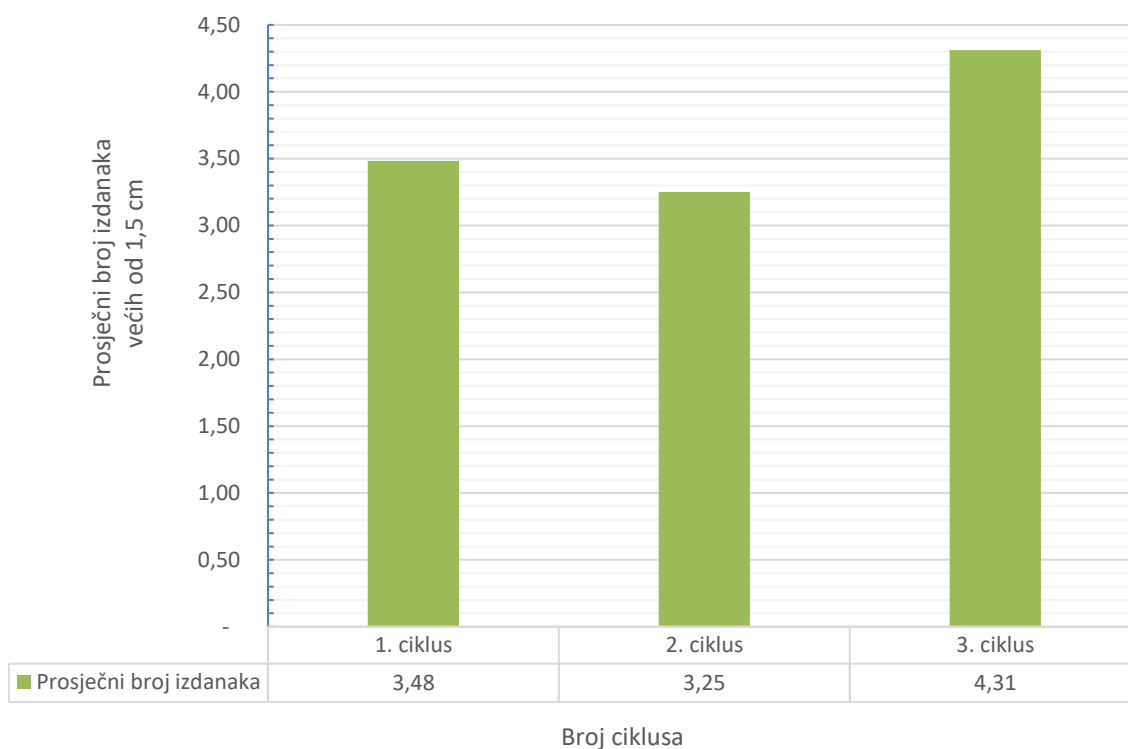
Kao što je bilo očekivano, prilikom razvoja kalusnog tkiva na MSD4 podlozi dolazi do formiranja meristematskog tkiva i sitnih izdanaka s vrlo kratkim internodijima. Ovdje se zapažaju prve razlike između tretmana. Kalusno tkivo na mediju u kojem se nalazio BAP kao citokinin je kroz tri ciklusa supkultivacija i održavanja regeneracijskog kapaciteta izmjenjivanjem medija s viskom koncentracijom citokinina i medija za regeneraciju izdanaka s niskom koncentracijom citokinina generiralo čak 496 izdanaka od početno postavljenih 17 bulk-ova (Tablica 4.2.2), dok je od početno postavljenih 21 bulk na medijima s TDZ-om razvijeno 265 izdanaka (Tablica 4.2.1). Kroz cjelokupni proces, od postavljanja početnih 16 eksplantata, preko razvoja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala, kroz šest mjeseci razvijeno je ukupno 942 nova izdanka dužih od 10 mm na MS podlogama s BAP-om kao citokininom. Dakle, ovim bi načinom stopa multiplikacije kroz 6 mjeseci na MS mediju s BAP-om iznosila 58.88 izdanaka po jednom postavljenom eksplantatu tj. 9,81 na mjesečnoj bazi. Kada je u prvoj fazi razvoja meristematskog tkiva korišten BAP, a u fazi održavanja regeneracijskog potencijala TDZ postoji potencijal razvoja 711 izdanaka što predstavlja stopu multiplikacije od 44.44 izdanka razvijena kroz 6 mjeseci po jednom početnom eksplantatu tj. 7,41 na mjesečnoj bazi. Tretman s BAP-om kao glavnim citokininom dao je 132,48% (1.32 puta) veću stopu multiplikacije u odnosu na isti tretman na podlozi s TDZ-om.

U ostalim se istraživanjima vezanim za mikropropagaciju Gale također pojavljuju razlike pri uzgoju s BAP-om i TDZ-om kao citokininom. Primjerice, prema istraživanju Van Nieuwkerk i sur. (1986.) mikropragacijom Gale na istom mediju s istom vrstom i količinom auksina i giberelina uz razliku vrste citokinina, najveća stopa multiplikacije zabilježena je na MS mediju s TDZ-om. Mjesečna stopa multiplikacije bila je $9,53 \pm 2,4$ nova izdanka po početnom eksplantatu na mediju s TDZ-om te $8 \pm 2,4$ na mediju s BAP-om što čini razliku od svega 19,13% kada se rezultati međusobno usporede. S druge strane, prilikom eksperimenata s utjecajima fotoperiodizma, V. R. Bommineni i sur. (2001) su iste efekte promatrali između ostalog i na stopi multiplikacije jabuka na MS mediju s BAP-om i TDZ-om pri čemu se stopa multiplikacije pokazala najvećom u grupi biljaka tretiranih BAP-om koje nisu bile izložene tami te grupi koja je bila tretirana TDZ-om i koje su prvotno bile u tami. U konačnici nisu uočene signifikantne razlike između korištenih regulatora rasta.

4.3 Uspješnost aksilarnog grananja vršnih izdanaka jabuke sorte Gala

Za usporedbu uspješnosti mikropropagacije jabuke Gale formiranjem meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala i klasične mikropropagacije, na MSG medij su vertikalno postavljeni vršni izdanci. Postavljeni su eksplantati imali minimalno 2 nodija te su dužine oko 1 cm. Vršanjem supkultivacija u rasponu od 3 mjeseca, prikupljeni su sljedeći podaci te su isti iskazani na Grafikonu 4.3.1:

Grafikon 4.3.1 Prosječni broj izdanaka dužih od 1,5 cm dobiveni aksilarnim grananjem vršnih izdanaka jabuke sorte Gala

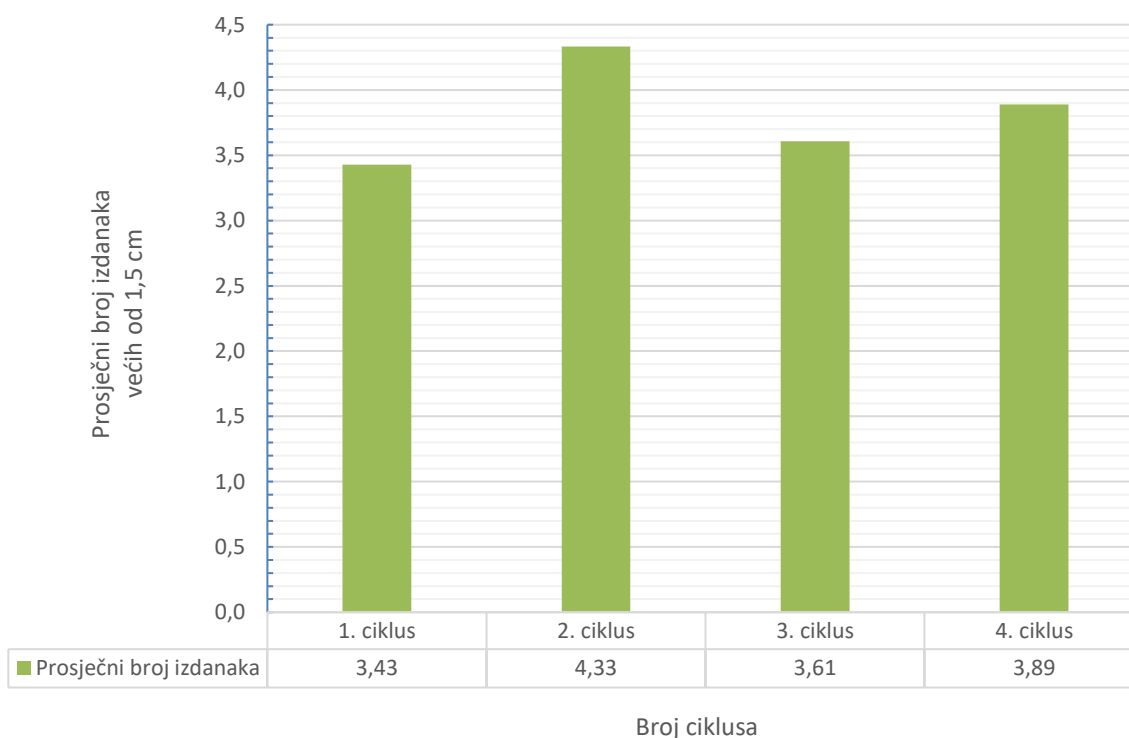


Proučavanjem podataka dobivenih metodom klasične mikropropagacije aksilarnog grananja vršnih izdanaka utvrđena je kod ove metode prosječna stopa multiplikacije 3,68 izdanaka po svakom eksplantatu jabuke Gale te je na ovaj način od početno postavljenih 31 eksplantata, dobiveno u 3 ciklusa supkultivacije 268 novih izdanaka u razdoblju od 3 mjeseca. Uz ovakvu stopu multiplikacije kroz 6 mjeseci bismo mogli očekivati razvoj 17,29 izdanaka po jednom postavljenom eksplantatu uz mjesečnu multiplikaciju od 2,88.

4.4 Uspješnost aksilarnog grananja horizontalno postavljenih izdanaka jabuke sorte Gala

Kao druga metoda usporedbe uspješnosti mikropropagacije jabuke Gale formiranjem meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala i klasične mikropropagacije, na MSG medij su horizontalno postavljeni izdanci odrezanog vrha i odrezanih listova. Postavljeni su eksplantati imali minimalno 2 nodija te su dužine oko 1 cm. Vršenjem supkultivacija u rasponu od 4 mjeseca, prikupljeni su sljedeći podaci te su isti iskazani na Grafikonu 4.4.1:

Grafikon 4.4.1 Prosječni broj izdanaka dužih od 1,5 cm dobiveni aksilarnim grananjem horizontalno postavljenih vršnih izdanaka jabuke sorte Gala

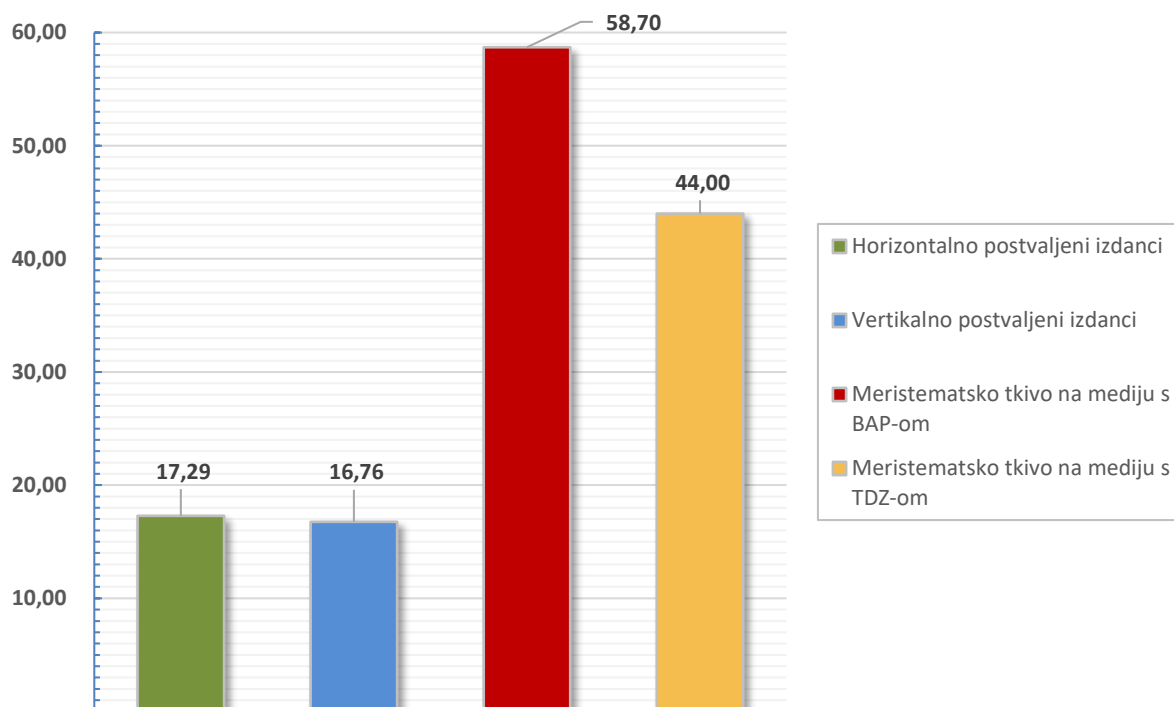


Daljnijim proučavanjem podataka dobivenih metodom klasične mikropropagacije aksilarnog grananja horizontalno postavljenih vršnih izdanaka utvrđena je kod ove metode prosječna stopa multiplikacije od 3,814 izdanaka po svakom eksplantatu jabuke Gale te je na ovaj način od početno postavljenih 28 eksplantata, kroz 4 ciklusa supkultivacije dobiveno 313 novih izdanaka u razdoblju od 4 mjeseca. Uz ovakvu stopu multiplikacije kroz 6 mjeseci bismo mogli očekivati razvoj 16,76 izdanaka po jednom postavljenom eksplantatu uz mjesečnu multiplikaciju od 2,79.

4.5 Usporedba uspješnosti regeneracije izdanaka klasičnom metodom aksilarnog grananja i formiranjem meristematskog tkiva visokog regeneracijskog kapaciteta

Prilikom usporedbe dobivenih rezultata na Grafikonu 4.5.1 prikupljenih klasičnim metodama mikropropagacije i metode razvoja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala, opaža se da je metoda razvoja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala generirala u istom vremenskom intervalu (6 mjeseci) 58,87 izdanak po jednom postavljenom eksplantatu na tretmanima s BAP-om. U slučaju tretmana s TDZ-om, u intervalu od 6 mjeseci po jednom postavljenom eksplantatu očekujemo da stopa multiplikacije iznosi 44,44. Razlika u pristupu mikropropagaciji na način da se razvija prvo meristematsko tkivo visokog regeneracijskog potencijala pokazala se boljom u usporedbi sa standardnim metodama mikropropagacije postavljanjem vršnih izdanaka vertikalno i horizontalno. Standardna metoda s horizontalno postavljenim izdancima, prema stopi multiplikacije utvrđene našim pokusom kroz 6 mjeseci bi generirala 17,29 izdanaka, dok bi prema izračunatim stopama multiplikacije vertikalno postavljeni izdanci generirali 16,76 novih izdanaka po jednom postavljenom eksplantatu.

Grafikon 4.5.1 Grafikon usporedbe stope multiplikacije izdanaka kroz 6 mjeseci po jednom početnom eksplantatu dužih od 10 mm između standardnih metoda mikropropagacije te metode razvoja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala



5. Zaključak

Klasična mikropropagacija se na jabuci vrši preko 50 godina kako je riječ o ekonomski važnoj kulturi. Na njoj se, kao i na drugim kulturama, testiraju i istražuju različite metode i tretmani postavljeni i utemeljeni na drugim kulturama. Metoda Mezzettija i sur. (2002.) za razvoja tkiva visokog regeneracijskog potencijala na vinovoj lozi dala je novi način razvoja izdanaka iz meristematskog tkiva koji se pokazao iznimno kvalitetan za mikropropagaciju na novom nivou uz povećanje ukupnog broja dobivenih izdanaka kao i dosljedno, pa čak i višestruko, povećanje stope multiplikacije. Takav način razvoja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala može biti iznimno koristan početni materijal za početak vegetativne propagacije zbog promjena iniciranih u samom biljnom tkivu koje se mogu iskoristiti za rapidni rast izdanaka i aktivirati postavljanjem na hranjivu podlogu adekvatnog sastava.

U usporedbi s provedenim klasičnim metodama mikropropagacije, metoda razvoja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala je generirala 75,11% ukupnog broja uz činjenicu da je, prilikom provođenja supkultivacije nakon dobivanja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala, cijeli postupak podijeljen na dvije skupine gdje je prva grupa supkultivirana na medij u kojem je izvor citokinina bio BAP te druga grupa u kojoj je izvor bio TDZ. Meristematsko tkivo visokog regeneracijskog potencijala je na podlozi s BAP-om generiralo čak 42,93% ukupnog broja dobivenih izdanaka, dok je paralelno na mediju s TDZ-om dobiven marginalno veći broj izdanaka nego putem metoda klasične mikropropagacije. Evidentno je također da je jabuka sorte Gala puno bolje reagirala na BAP nego na TDZ što se znatno odrazilo na stopu multiplikacije koja je bila oko 1,32 puta (132%) veća na meristematskom tkivu koje je bilo mediju u kojem je BAP.

Temeljem dobivenih rezultata, metoda razvoja meristematskog tkiva visokog regeneracijskog potencijala čini se kao jedan od budućih načina mikropropagacije jabuke. Razvoj meristematskog tkiva u svrhu ciljanog razvoja novih izdanaka je zanimljiv i koristan koncept specijalizacije meristematskog tkiva kod kojeg na razini staničnog tkiva dolazi do promjena koje nam omogućavaju bržu vegetativnu propagaciju kako bismo zadovoljili trenutne, ali namirili i buduće potrebe u proizvodnji jabuke.

6. Popis literature

1. Bandurski R.S. (1979). Chemistry and physiology of myo-inositol esters of indole 3-acetic acid. In: Wells W.W., Eisenberg, F. Jr . Cyclitols and Phosphoinositides. Academic Press, London, New York. 35-54.
2. Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen, R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell*. 7:1099-1111.
3. Bommineni V.R., Mathews H., Samuel S.B., Kramer M., Wagner D.R. (2001). A New Method for Rapid In vitro Propagation of Apple and Pear. *HortSci* 36 (6): 1102-1106. doi:10.21273/HORTSCI.36.6.1102
4. Braun A.C. (1958). A physiological basis for autonomus growth of the Crown-gall tumor cell. *Proc. National Acad. Sci, Washington*. 44:344.
5. Cornille A., Gladieux P., Smulders M.J., Roldán-Ruiz I., Laurens F., Le Cam B., Nersesyan A., Clavel J., Olonova M., Feugey L., Gabrielyan I., Zhang XG., Tenaillon M.I., Giraud T. (2012). New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genet*. 8(5):e1002703. doi: 10.1371/journal.pgen.1002703.
6. Crkvenac, M. (2019). Ispitivanje otpornosti tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *Penicillium expansum*, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, citirano: 04.04.2022., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:629901>
7. Cuthbertson D., Andrews P. K., Reganold J. P., Davies N. M., Lange B. M. (2012). Utility of metabolomics toward assessing the metabolic basis of quality traits in apple fruit with an emphasis on antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(35): 8552–8560.
8. Dobránszki J., Teixeira da Silva J.A. (2010). Micropropagation of apple — A review. *Biotechnol Adv* 28: 462–488. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.008
9. Janick J., Cummins J.N., Brown S.K., Hemmat M. (1996). *Fruit Breeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits*. John Wiley & Sons. ISBN: 0-471-31014-X
10. Jelaska, S. (1994). *Kultura biljnih stanica i tkiva, Školska knjiga*. ISBN: 978-953-0-31110-7.
11. Kolattukudy P.E. (1984). Natural Waxes on Fruits. *Post Harvest Pomology Newsletter*, 2(2):3-7. Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman.
12. Loewus F., Loewus M.W. (1983). Myo-inositol: Its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*. 34:137-161.
13. Magyar-Tábori K., Dobránszki J., Teixeira da Silva J. A, Bulley S. M, Hudák I. (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell, Tissue, and Organ Cult* 101: 251-267. doi: 10.1007/s11240-010-9696-6
14. Marković, Z., i Preiner, D. (2011). 'Biotehnologija u vinogradarstvu', *Glasnik Zaštite Bilja*, 34(1), str. 58-67. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/163277> (Datum pristupa: 10.07.2022.)
15. Međedović, S., Dž. Ferhatović. (2003). *Klonska proizvodnja sadnica drveća i grmlja*. Bemust, Sarajevo.
16. Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O. et al. (2002). Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. *BMC Biotechnol* 2: 18. doi:10.1186/1472-6750-2-18

17. Mohammadipour N., Souri M.K. (2019). Beneficial effects of glycine on growth and leaf nutrient concentrations of coriander (*Coriandrum sativum*) plants. *Journal of Plant Nutrition*. 42:14, 1637-1644. DOI: 10.1080/01904167.2019.1628985
18. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
19. Pavlina, R. (1994). Mikropropagacija: mogućnosti njene primjene u hrvatskoj poljoprivredi. *Sjemenarstvo*. 11(5): 317-326
20. Pintarić B. (2008). Mikropropagacija bijele topole (*Populus alba* L.). *Šumarski list*. 132(7-8): 343-354
21. Preiner D., Marković Z., Šikuten I., Maletić E., Karoglan Kontić J., Bošnjak Mihovilović A., Žulj Mihaljević M. (2019). In vitro synthesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) intraspecific chimeras using meristematic bulk tissue grafting. *Sci Hortic* 246: 965-970. doi:10.1016/j.scienta.2018.11.085
22. Steinhart C.E., Anderson L., Skoog F. (1962). Growth promoting effect of cyclitols in spruce tissues. *Plant Physiol*. 37:60.
23. Steinhart C.E., Standifer L.C. Jr., Skoog F. (1961). Effect of amino acid components of yeast extract on spruce tissues. *Amer. J. Bot.* 48:465.
24. Svetozarević G. (2018). Gala, letnja jabuka čija popularnost raste. *Poljoprivredne savetodavne i stručne službe Srbije*
25. University of Reading, ECPGR. (2019). "National Fruit Collection" baza podataka. <http://www.nationalfruitcollection.org.uk/full2.php?id=2183&&fruit=apple>
26. Van Nieuwkerk J.P., Zimmerman R.H., Fordham I. (1986). Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro. *HortScience* 1986;21:516-8.
27. Vinterhalter D., Vinterhalter B. (1996). *Kultura in vitro i mikropropagacija biljaka*. Axial, Beograd.
28. Vrhovsek U., Rigo A., Tonon D., Mattivi F. (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(21): 6532-6538.

7. Životopis

Rođen sam u Sisku 10. srpnja 1997. godine. Odrastao sam u Sisku gdje sam pohađao opću gimnaziju od 2012. do 2016. godine. U razdoblju od 2011. do 2016. sam pohađao Glazbenu školu „Frana Lhotke“ u Sisku gdje sam završio dva razreda pripremne za trubu te tri razreda srednje škole za glazbenog teoretičara. Trenutno sam student pete godine Agronomskog fakulteta u Zagrebu smjera biljnih znanosti koji sam upisao 2016. godine. Govorim, pišem i razumijem engleski tečno sve na razini iskusnog korisnika (C1), dok njemački znam na razini samostalnog korisnika (B1). Vješto baratam Microsoft Office programima te imam karakteristike samostalnog te iskusnog korisnika u obradi informacija, digitalnih komunikacija, stvaranja sadržaja, sigurnosti i rješavanja informatički problema. Aktivan sam član Akademskog zbora „Ivan Goran Kovačić“ od 2017. godine u kojem sam od 2019. godine član upravnog odbora. Jedan sam od tri člana osnivača humanitarne udruge „Aksis“ na području Siska s ciljem rada i podučavanja mladih, posjet i rad s nezbrinutom djecom, starijima i nemoćnima te rad u centru za nezbrinute i napuštene životinje. Posjedujem vozačku dozvolu kategorije AM i B.