

Utjecaj citokinina na mikropropagaciju, morfologiju i razinu stresa kod kapara (*Capparis orientalis* Veill.)

Jembrek, Davor

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:204:616166>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Utjecaj citokinina na mikropropagaciju, morfologiju
i razinu stresa kod kapara (*Capparis orientalis* Veill.)**

DIPLOMSKI RAD

Davor Jembrek

Zagreb, rujan, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Biljne Znanosti

**Utjecaj citokinina na mikropropagaciju, morfologiju
i razinu stresa kod kapara (*Capparis orientalis* Veill.)**

DIPLOMSKI RAD

Davor Jembrek

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Davor Jembrek**, JMBAG 0178112562, rođen 10.11.1997. u Koprivnici, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**Utjecaj citokinina na mikropropagaciju, morfologiju i razinu stresa kod kapara
(*Capparis orientalis* Veill.)**

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

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Davora Jembreka**, JMBAG 0178112562, naslova

**Utjecaj citokinina na mikropropagaciju, morfologiju i razinu stresa kod kapara
(*Capparis orientalis* Veill.)**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

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

potpisi:

Zahvala

Prije svega zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Bošnjak Mihovilović na pomoći, strpljenju i upornosti prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Također zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ivanki Habuš Jerčić na pomoći i savjetima koji su me uvelike riješili stresa i učinili moju apsolventsku godinu boljom nego što sam mogao očekivati.

Zahvaljujem se dr.sc. Ivani Tomaz što mi je izašla u susret i pomogla oko kemijskih analiza.

Veliko hvala mojim roditeljima Dubravki i Darku te obitelji na bezuvjetnoj podršci, bez vas ovo obrazovanje i diploma ne bi bili mogući. Posebno hvala mojoj teti Senki na podršci i „časticama razgovora“.

Također zahvaljujem rodbini i prijateljima koji su bili tu kao podrška tijekom ovih godina studiranja, a posebno hvala mojoj Anamariji i Teodori na svemu što smo prošli i proživjeli.

Naposljetku hvala domskoj ekipi s Lašćine na svim avanturama, razgovorima i podršci bez kojih ne bih odrastao u osobu kakva sam danas.

Sadržaj

1.Uvod.....	1
1.1.Hipoteza i ciljevi rada	2
2.Pregled literature	3
2.1.Podrijetlo i klasifikacija kapara.....	3
2.2.Morfološke karakteristike	4
2.3.Upotreba kapara kroz povijest i kemijski sastav.....	5
2.4.Rasprostranjenost kapara u Hrvatskoj.....	6
2.5.Kapar u kulinarstvu	8
2.6.Kultura tkiva i mikropropagacija	8
2.7.Citokinini	10
2.7.1.Usporedba 6-benzilamonipurina i Meta-topolina.....	11
2.8.Reaktivni kisikovi spojevi (ROS)	13
2.8.1.Superoksid dismutaza (SOD)	14
2.8.2.Peroksidaza (POX)	15
2.8.3.Ukupni proteini.....	15
2.9.Kapar u kulturi tkiva	16
3.Materijali i metode	18
3.1.Biljni materijal	18
3.2.Autoklaviranje i sterilizacija instrumenata	18
3.3.Priprema hranjivog medija.....	18
3.4.Multiplikacija izdanaka kapara	19
3.5.Analize fotografija lisne površine	20
3.6.Mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima i ukupnih membranskih proteina.....	21
3.6.1.Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).....	21
3.6.2.Mjerenje aktivnosti peroksidaze (POX)	23
3.6.3.Određivanje koncentracije proteina po Bradford-u	23
3.7.Statistička analiza.....	24
4.Rezultati i rasprava.....	25
4.1.Učinak vrste i doze citokinina na stopu multiplikacije	25
4.2.Učinak vrste i doze citokinina na lisnu površinu	27
4.3.Učinak vrste i doze citokinina na razinu aktivnosti hormona stresa te razinu ukupnih proteina	28
4.4.Učinak vrste i doze citokinina na razinu aktivnosti hormona stresa te razinu ukupnih proteina	28
4.4.1.Aktivnost superoksid dismutaze (SOD)	28
4.4.2.Aktivnost peroksidaze (POX).....	29
4.4.3.Ukupni sadržaj toplivih proteina	30
5.Zaključak.....	32

6.Literatura	33
7.Životopis.....	37

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Davora Jembreka**, naslova

Utjecaj citokinina na mikropropagaciju, morfologiju i razinu stresa kod kapara (*Capparis orientalis* Veill.)

Biljka kapara zbog niske klijavosti i visokog stupnja heterozigotnosti u sjemenu neprikladna je za razmnožavanje konvencionalnim metodama. Kao jedno od rješenja koje bi pospješilo i ubrzalo razmnožavanje ove biljne vrste je mikropropagacija. Najčešće korišteni citokinin u svrhu mikropropagacije kapara (*C. orientalis* Veill.) je 6-benziloaminopurin (BAP). Metatopolin (mT) se smatra alternativom BAP-u jer osigurava visoke stope umnožavanja uz manje negativnih posljedica. Upotreba citokinina koja je nužna za multiplikaciju *in vitro* može dovesti do stresnih uvjeta i povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih oblika (ROS) koji ograničavaju mikropropagaciju jer dovode do morfofizioloških promjena i aktivacije enzima stresa. Cilj rada je bio odrediti učinak vrste i doze citokinina na stopu multiplikacije, lisnu površinu i razinu aktivnosti enzima stresa i ukupnih proteina u izdancima kapara u *in vitro* uvjetima.

Ključne riječi: kapar, citokinini, ROS, lisna površina

Summary

Of the master's thesis – student **Davor Jembrek** entitled

The effect of cytokinins on *in vitro* multiplication, morphology and oxidative stress of caper (*Capparis orientalis* Veill.) shoots.

Due to low germination and high degree of heterozygosity in the seeds, the caper plant is not suitable for propagation by conventional methods. Micropropagation is one of the solutions that would promote and speed up the reproduction of this plant species. The most used cytokinin for the purpose of micropropagation of caper (*C. orientalis* Veill.) is 6-benzylaminopurine (BAP). Metatopolin (mT) is considered as an alternative to BAP because it provides high multiplication rates with fewer negative consequences. The use of cytokinin, which is necessary for multiplication *in vitro*, can lead to stressful conditions and increased production of reactive oxygen species (ROS) that limit micropropagation. They lead to morphophysiological changes and activation of stress enzymes. The aim of the work was to determine the effect of the type and dose of cytokinin on the multiplication rate, leaf area and level of stress enzyme and protein activity in caper shoots *in vitro*.

Keywords: caper, cytokinin, ROS, leaf surface

1. Uvod

Kapar (*Capparis orientalis* Veill.) može se protumačiti kao duh života, a to se također odražava kao sposobnost roda *Capparis* da se nastani u nepovoljnim staništima, primjerice rastući izravno iz kamena ili u najžešćim i najsušim pustinjama (Landsky i sur. 2014.). Kapar je kserofilna vrsta sa sjajnom sposobnošću prilagođavanja na ekstremne uvjete. Crpljenje vode iz stjenovitih i suhih tala pomoću dobro razvijenog korijenovog sustava te stabljika koja pokriva površinu i na taj način pomaže u nakupljanju vode u tlu čine ovu biljku otpornom i izuzetno prilagodljivom teškim klimatskim uvjetima (Kereša i sur. 2019.).

Kemijska istraživanja na kaparu utvrdila su različiti sadržaj brojnih korisnih spojeva. Različiti dijelovi biljke kapara mogu se koristiti kao lijek, u kozmetici te u kulinarstvu. Prije komercijalizacije nezreli cvjetni pupoljci se zakisele u octu ili konzerviraju u soli. Također, kod kiseljenja kapara preferiraju se plodovi sa manjim, mekim sjemenkama (Sher i Alyemeni, 2010.).

Do sada se kapar uglavnom razmnožavao pomoću sjemena i vegetativno. Međutim, omotač sjemena je čvrste strukture zbog čega je klijavost slaba, pa može zahtijevati kemijsku ili mehaničku obradu (Carra i sur. 2012.). Mikropropagacija se nudi kao jedno od rješenja za razmnožavanje kapara (Kereša i sur. 2019.). Biotehnologija, što podrazumijeva uzgoj kulture *in vitro* i mikropropagaciju, može proizvodnjom sadnica značajno doprinijeti povećanju proizvodnih površina kapara. Najznačajnija prednost mikropropagacije u odnosu na razmnožavanje u *in vivo* uvjetima je velika stopa umnožavanja (Marković i Preiner, 2011.).

Kao jedan od važnih regulatora rasta biljaka potrebnih tijekom kulture tkiva, citokinini (CK) su uključeni u procese kao što su proizvodnja izdanaka i pigmenta, kao i odgađanje starenja. (Aremu i sur. 2012.). Vrsta i koncentracija CK utječu i na fotosintetski potencijal biljaka uzgajanih u *in vitro* uvjetima (Aremu i sur. 2012.). Zbog svoje učinkovitosti i pristupačnosti najkorišteniji citokinin u mikropropagaciji je 6-benzilaminopurin (BAP), međutim kod nekih biljnih vrsta su uočeni nedostaci (Bairu i sur. 2007.). Kao alternativa BAP-u sve veća je upotreba topolina, posebno meta oblika zbog svoje sposobnosti da ublaže različite fiziološke poremećaje i pospješuju opći rast biljaka (Aremu i sur. 2012.). Upotreba citokinina je nužna za multiplikaciju *in vitro* ali može dovesti do stresa i povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih oblika (ROS) koji ograničavaju mikropropagaciju jer dovode do morfofizioloških promjena i aktivacije enzima stresa.

1.1. Hipoteza i ciljevi rada

Hipoteza ovog rada je da će izdanci kapara razvijeni na mediju s dodatkom mT imati veću stopu multiplikacije, veću lisnu površinu te niže razine antioksidacijskih enzima i niži sadržaj ukupnih proteina od onih razvijenih u mediju s dodatkom BAP-a.

Ciljevi rada:

- 1.) Odrediti učinak vrste i doze citokinina na stopu multiplikacije;
- 2.) Odrediti lisnu površinu i razinu aktivnosti enzima stresa i ukupnih proteina u izdancima kapara u *in vitro* uvjetima s obzirom na korištenu vrstu i dozu citokinina.

2. Pregled literature

2.1. Podrijetlo i klasifikacija kapara

Rod *Capparis* je veliki rod koji se sastoji od 250-400 vrsta koje se nalaze u tropskim i subtropskim područjima Starog i Novog svijeta, no također obitava u mediteranskim područjima i državama jugozapadne Azije. Pripada obitelji *Capparaceae*, obitelji od oko 45 rodova i 675 vrsta u tropima obje hemisfere (Landsky i sur. 2014.). Najvažnija komercijalna vrsta kapara je *Capparis spinosa* koji uglavnom prevladava u područjima Sredozemnog bazena koja su glavni proizvođači te biljne vrste. Neke od vrsta koje se koriste u prehrambenoj industriji su *C. sicula*, *C. obvata*, *C. ovata*, *C. decidua*, *C. masaikai*, *C. sicula*, *C. orientallis* i *C. zoharyi* (Tlili i sur. 2011.).

Tablica 2.1.1. Sistematika kapara

TAKSONOMIJA

Carstvo	<i>Plantae</i>
Divizija	<i>Angiospermae</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Brassicales</i>
Porodica	<i>Capparaceae</i>
Rod	<i>Capparis</i>
Vrsta	<i>Capparis L</i>

Izvor: Retrieved from the Integrated Taxonomic Information System (ITIS)
(<http://www.itis.gov>).



Slika 2.1.1. Kapar na ostacima Dioklecijanove palače u Splitu
(Izvor: <https://slobodnadalmacija.hr/>)

2.2. Morfološke karakteristike

Kapar je kserofilna vrsta koja ima sjajan mehanizam prilagodbe na iznimno suhe uvjete. Ta biljna vrsta posjeduje iznimnu sposobnost prilagođavanja u regijama s promjenjivom klimom. Crpljenje vode iz suhih i stjenovitih tala je posebna sposobnost ove biljne vrste (Kereša i sur. 2019.). Biljka kapara je grmolikog oblika, visine 30-100 cm (Tili i sur. 2011.). Stabljika je zimzelena i obično se penje, ponekad je ležeća i prekrivena kratkim zakrivljenim bodljama. Mlade grančice su prekrivene jednostavnim zvjezdastim dlačicama i lepidotnim ljuskicama. Listovi su naizmjenični, jednostavni, cjeloviti ili polucjeloviti, često kožasti s bodljikavim stipulama. Cvijet kapara je hermafroditan, pojedinačan, smješten vršno ili terminalno na dugoj stapci iz pazuša lista. Cvijet se sastoji od četiri lapa i četiri latice, sa jednim tučkom i mnogobrojnim prašnicima. Latice su bijele do bijelo-roze boje zaobljeno-jajolikog oblika. Tučak je približno iste dužine kao i prašnici, no sa starenjem cvijeta se izdužuje. Plod je jajolika ili dugoljasta bobica sa glatkim ili užljebljenim perikarpom. Kada je plod suh perikarp može biti različite boje i ne puca po središnjoj membrani. Plod može sadržavati od jedne pa do mnogobrojnih sjemenaka bubrežastog oblika (Landsky i sur. 2014.).



Slika 2.2.1. Biljka kapara
Izvor: <http://dryades.units.it/>

2.3. Upotreba kapara kroz povijest i kemijski sastav

Korijen, lišće, pupoljci, plodovi, kora i sjemenke kapara od davnina se koriste u medicini za liječenje bolesti poput reume, želučanih tegoba, glavobolje i zubobolje. Još iz drevnog vremena stari Egipćani i Arapi koristili su korijen kapara u liječenju bolesti bubrega, jetre, želuca te kod uboda škorpiona. Drevni Arapi su koristili lišće kapara protiv kožnih bolesti, bolova u uhu i za ubijanje ličinki koje bi se nastanile u uhu. Također koristili su pupoljke u liječenju bolesti slezene. Ovaj dio kapara stari Rimljani koristili su u liječenju paralize. Cvijeće se koristilo kao stimulans za povećanje erekcije i ublažavanje bolova. Stari Grci koristili su plodove u liječenju konvulzija. Sjemenke su koristili stari Arapi kao lijek za probleme s desnim, a stari Egipćani i Grci za ublažavanje bolova prilikom menstruacije. Iranci su koristili korijenje, plod i kora biljke kao diuretike i razne tonike protiv malarije i zglobnih bolesti. Stabljike, plodovi i korijenje korišteni su u tradicionalnoj kineskoj medicini za liječenje reumatoidnog artritisa i gihta (Chedraoui i Rajjou, 2017; Tlili i sur. 2011.).

Kemijske i bioaktivne komponente različitih dijelova kapara (korijen, sjemenke, listovi, pupoljci i plodovi) ispitivani su i kvantificirani u nekoliko istraživanja. Kao što je dokazalo nekoliko studija, kapari su bogati fenolnim spojevima i flavonoidima. Ovi sekundarni metaboliti često imaju ulogu u odgovoru na abiotičke stresove koji su široko povezani s tolerancijom na toplinu (Wahid i sur. 2007.). Na primjer, ukupni fenoli u metanolnom ekstraktu listova kapara s različitih lokacija u Indiji kretali su se od 21,42 do 27,62 mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu suhe težine (DW). Ukupni sadržaj fenola u vodenom ekstraktu listova tuniskog kapara bio je 33,55 mg GAE/g DW, ukupni sadržaj fenola u vodenom ekstraktu pupova bio je 67,29 mg GAE/g DW, a ukupni sadržaj fenola u hidroetanolnom ekstraktu lista bio je 427,27 mg GAE/g DW. Ukupni flavonoidi bili su 57 mg kvercetinog ekvivalenta (QE)/g DW u etanolnom ekstraktu lista, 2,6 do 6,96 mg QE/g DW u metanolnom ekstraktu

lista, 13,97 mg QE/g DW u vodenom ekstraktu listova i 25 mg QE/g DW cvijeća (Chedraoui i Rajjou, 2017.). *C. spinosa* se smatra dobrim izvorom fenolnih kiselina, alkaloida, flavonoida (rutin, kvercetin, kempferol) i glukozinolata (heparin, glukozid, nigrosin, glukozinolat) (Francesca i sur. 2016; Kulisic-Bilusic i sur. 2012.). Alkaloidi su jedna od fiziološki najaktivnijih klasa spojeva koji se nalaze u biljkama i često utječu na živčane i druge važne fiziološke funkcije kod životinja. Po definiciji, ti se organski spojevi sastoje od kostura ugljikovih atoma, koji također uključuju dušik. Kod *Capparis* roda najzastupljeniji alkaloid je stahidrin koji je prisutan u svim dijelovima *C. spinosa* (Yin i sur. 2010.). Utvrđivanje kemijskog sastava eteričnog ulja *C. spinosa* bio je predmet nekoliko studija (Afsharypuor i sur. 1998; Kulisic-Bilusic i sur. 2010; Muhaidat i sur. 2013.). Afsharypuor i sur. (1998.) odredili su 22 komponente u eteričnom ulju ekstrahiranom iz lišća, plodova i korijena. Prinos se kretao od 0,02 do 0,9% (Afsharypuor i sur. 1998.).

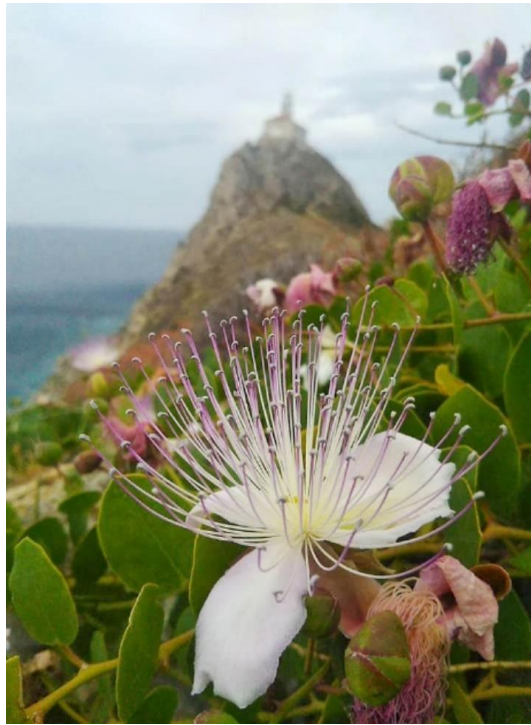
Tablica 2.3.1. Hranjiva vrijednost plodova kapara (na 100 g)

<i>Sadržaj</i>	<i>Iznos na 100 grama</i>
<i>Energija</i>	20 kcal
<i>ugljikohidrati</i>	5 g
<i>masti</i>	0,9 g
<i>vlakna</i>	3 g
<i>šećer</i>	0,4 g
<i>natrij</i>	2960 mg
<i>željezo</i>	1,7 mg
<i>bjelančevine</i>	2 g
<i>vitamin c</i>	4 mg

(Izvor: Sher i Alyemeni, 2010)

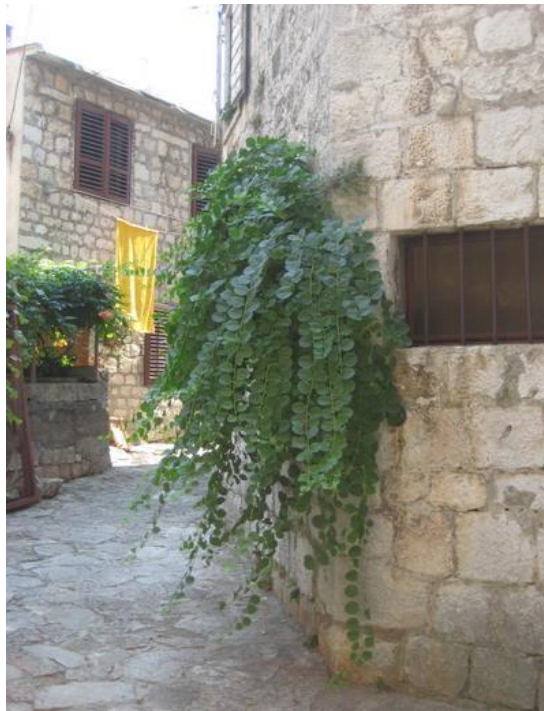
2.4. Rasprostranjenost kapara u Hrvatskoj

U našim krajevima ova biljka samoniklo raste na otocima i otočićima jadranske obale, srednje i južne Dalmacije. U Hrvatskoj se kapari ne uzgajaju u komercijalne svrhe. Kuštrak (2014.) navodi da su kapari široko rasprostranjeni uz obalu Hrvatske i Dalmacije te da su jedina biljna vrsta iz tropske/suptropske obitelji *Capparidaceae*. Najviše se može naći u stijenama, starim kućama i pukotinama gradskih zidina. Na našoj obali kapari su prisutni na obalnim područjima i priobalnim otocima južnog Jadrana sve do pučinskih otoka Palagruže i Sveca. Na srednjem Jadranu nalazimo ga sve do Zadra i Silbe iznad koje je rijedak, osim starog dijela Raba, kao i u Dubrovniku i Komizi. U većini dvorova, vrtova, samostana, povijesnih građevina rastu kapari, kao primjerice dvor Jurja Dalmatinca u Šibeniku, ljetnikovac Petra Hektorovića, samostani na otoku Mljetu, klarise Dubrovnik, tvrđave Hvar, povijesne zidine Dioklecijanove palače te mnogi drugi (Kovačević, 2014.).



Slika 2.4.1. Kapar na Palagruži

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



Slika 2.4.2. Kapar na zidu

(Izvor: <https://www.naturala.hr/omiljeni-kapari-s-pijavice-i-goza/>)

2.5. Kapar u kulinarstvu

Biljka kapara dobro je poznata u kulinarstvu. Kao hrana koriste se neotvoreni pupoljci kapara, ubrani i stavljeni u ocat ili slanu vodu i ulje (Grčka). Na Cipru su kapari nacionalni specijalitet. Osim pupova u kulinarstvu mogu se koristiti mladi mesnati listovi i plodovi. Neotvoreni pupoljci se beru od kraja svibnja do početka rujna. Berba se najčešće obavlja ujutro prije izlaska sunca. Ubrane pupoljke potrebno je dobro oprati i ostaviti u hladu da uvenu te potom razvrstati po veličini kako nalaže tržište. Prema veličini dijele se u šest kategorija. Konzerviraju se u octu, rasolu ili ulju. Prije nego što kapari dospiju na tržište prolaze kroz maceraciju koja traje 3 mjeseca. Pripremljeni cvjetni pupoljci se ukiseljavaju u 5%-tnom octu uz dodatak kuhinjske soli. Čuvati se mogu u 6%-tnoj otopini soli uz dodatak 1%-tne octene kiseline (Kuštrak, 2014.). Grlić (2005.) navodi kako stajanjem u octu kapari razvijaju karakterističnu aromu i miris koja potječe od kaprinske kiseline. Kapari se dodaju raznim mesnim, ribljim jelima, salatama, umacima i sirevima.



Slika 2.5.1. Neotvoreni cvjetni pupoljci i plodovi kapara kao začin
(Izvor: <http://mykitcheninspain.blogspot.com/2014/04/the-great-culinary-caper.html>)

2.6. Kultura tkiva i mikropropagacija

Kultura biljnog tkiva naziva se još stanična ili aseptična kultura te je važan alat u osnovnim i primijenjenim studijama kao i u komercijalnoj primjeni (Thorpe, 1990.). Kultura biljnog tkiva je aseptična kultura stanica, tkiva, organa i njihovih komponenti u kontroliranim fizikalnim i kemijskim uvjetima *in vitro*. Schleiden i Schwann su 1838. godine predložili da je

stanica osnovna strukturna jedinica svih živih organizama. Oni su utvrdili autonomnost stanice i kako svaka stanica ima sposobnost da se u povoljnim uvjetima regenerira u cijelu biljku (Hussain i sur. 2012.). U kulturi tkiva biljno tkivo i organi rastu na umjetnoj podlozi *in vitro* pod aseptičnim i kontroliranim uvjetima. Tehnika se zasniva na konceptu totipotentnosti stanice tj. sposobnosti da se iz jedne stanice diobom razvije cijeli genom. Također uz totipotentni potencijal biljne stanice, sposobnost stanice da mijenja svoj metabolizam, rast i razvoj jednako je važna i ključna za regeneraciju cijele biljke (Hussain i sur. 2012.).

Medij za kulturu biljnog tkiva sadrži sve nutrijente potrebne za normalan rast i razvoj biljke. Najčešće se sastoji od makroelemenata, mikroelemenata, vitamina i drugih organskih komponenata, hormona rasta, izvora ugljika i nekog želatinoznog agensa, ako se radi o čvrstom mediju (Khanam i sur. 2020.). Najkorišteniji medij za vegetativnu propagaciju mnogih biljaka *in vitro* je Murashige-Skoog medij. Neki od često korištenih medija uz MS medij su, Linsmaier i Skoog (LS), White medij, Nitsch i Nitsch (NN) te Gamborg (B5) medij (Yildiz, 2012.). Veliku važnost ima pH medija koji ima utjecaj na rast biljaka i aktivnost biljnih hormona. Obično se prilagođava vrijednosti između 5,4 - 5,8. Za uzgoj se mogu koristiti čvrsti i tekući medij. Sastav medija posebno biljnih hormona, odnosno regulatora rasta i dušika ima velik utjecaj na odgovor početnog eksplantata. Regulatori rasta imaju važnu ulogu u određivanju razvoja biljnih stanica i tkiva u mediju kulture tkiva (Hussain i sur. 2012.). Regulatori rasta koji se najčešće koriste su auksini, citokinini i giberelini. Visoke koncentracije auksina općenito pogoduju stvaranju korijena, dok visoke koncentracije citokinina potiču regeneraciju mladica. Ravnoteža auksina i citokinina rezultira razvojem velikog broja nediferenciranih stanica, zvanih kalus. (Hussain i sur. 2012.). Dodatkom giberelina mediju za kulturu biljnog tkiva umanjuje se ili sprječava stvaranje korijena, izdanaka ili somatskih embrija, iako je također uočeno i suprotno (Gaspar i sur. 1996.). Tip i koncentracija hormona koji se koristi u kulturi tkiva ovisi o vrsti biljke koja se koristi kao eksplantat u istraživanju (Hussain i sur. 2012.).

Glavna prednost mikropropagacije je:

1. Brza proizvodnja visokokvalitetnih sadnica.
2. Ujednačeni sadni materijal bez bolesti.
3. Biljke se mogu razmnožavati i uzgajati u kontroliranom okruženju tijekom cijele godine, neovisno o godišnjim dobima i vremenskim uvjetima.
4. Proizvodnja kvalitetnog i zdravog sadnog materijala za ukrasne, šumske i voćne vrste koje se razmnožavaju iz biljnih dijelova te stvaraju nove mogućnosti za globalnu trgovinu, proizvođače, poljoprivrednike i rasadnike te zapošljavanje na selu (IAEA, 2004).

Proces mikropropagacije ima cilj proizvesti što više klonova majčinske biljke te ga čini nekoliko faza:

1. Korak pred razmnožavanje ili odabir odgovarajućih biljaka

2. Inicijacija eksplantata nakon čega slijedi površinska sterilizacija i uspostavljanje matičnih eksplantata na hranidbenu podlogu.
3. Supkultura za proliferaciju eksplantata.
4. Grananje i ukorijenjavanje eksplantata.
5. Zakorijenjavanje izdanaka i aklimatizacija

Ove su faze općenito primjenjive za razmnožavanje biljaka u velikom broju. Pojedine biljne vrste, sorte i klonovi zahtijevaju posebne modifikacije medija kako bi se potaknuo rast, prilagođavanje na nove uvjete rasta i ukorjenjivanje. Pravilo je da se uzgoj biljaka *in vitro* prilagodi sličnim uvjetima u prirodi odnosno *in vivo* (IAEA, 2004.).

Jelaska (1994.) navodi kako je tijekom procesa mikropropagacije eksplantate potrebno supkultivirati zbog sljedećih razloga:

- trošenje hranjive podloge
- sušenje hranjive podloge
- kultura koja se nalazi u epruveti ili tikvici je ispunila prostor
- potrebno je daljnje umnožavanje biljnog materijala
- smeđa ili crna obojanost podloge rezultat je ispuštanja tvari, primjerice fenola
- nekada je potrebno prenijeti materijal na podlogu sa drugačijim sastavom
- podloga je postala tekuća zbog sniženja pH uzrokovanog biljnim materijalom

2.7. Citokinini

Citokinini (CK) su skupina N6 supstituiranih derivata adenina koji utječu na mnoge aspekte rasta i razvoja biljaka. Četrdesetih i pedesetih godina prošlog stoljeća identificiran je širok raspon tvari, od ekstrakata kvasca do soka od rajčice, koje se vežu na auksine kako bi pokrenule i održale proliferaciju normalnog tkiva biljne stabljike u kulturi tkiva. Utvrđeno je kako tekući endosperm kokosovog mlijeka sadrži tvar koja ima najjače pozitivne učinke na diobu stanica (Kieber i Schaller, 2014.). U 1950-ima, Skoog i Miller otkrili su da je autoklavirana DNA iz sperme haringe snažan aktivator proliferacije stanica koštane srži duhana (Miller i sur. 1956). Identificirali su derivat adenina, 6-furfuril-aminopurin, kao aktivni spoj i nazvali ga kinetin. Kinetin stimulira proliferaciju parenhima u kulturi uz prisutnost auksina. Kasnije je zeatin identificiran kao prvi prirodni CK u nezrelom endospermu kukuruza i pokazalo se da je glavni CK u kokosovom mlijeku (Kieber i Schaller, 2014.).

CK igraju ključnu ulogu u reguliranju proliferacije i diferencijacije biljnih stanica, a također kontroliraju različite procese u rastu i razvoju biljaka, kao što je odgoda starenja, kontrola ravnoteže izdanaka/korijena, transdukcija nutritivnih signala i povećanu produktivnost usjeva (Sakakibara, 2006.). CK su regulatori rasta biljaka uključeni u biljni stanični ciklus i kontrolu razvoja, a njihova egzogena primjena u kulturi biljnog tkiva ima regulatornu ulogu u nekoliko morfologenetskih procesa. Međutim, izloženost biljaka neprikladnim vrstama ili koncentracijama CK može negativno utjecati na razmnožavanje što često smanjuje korištenje *in vitro* tehnika na nekim biljnim vrstama (Aremu i sur. 2012.).

Klasično se smatralo da se CK sintetiziraju u korijenu i prenose do izdanaka, ali nedavne studije su pokazale da se CK proizvode u cijeloj biljci, uključujući i nadzemne dijelove biljke (Kieber i Schaller, 2014.). Lazarević i sur. (2019.) navode kako je korijenov vegetacijski vrh glavno mjesto sinteze CK, no ne i jedino, primjerice mogu se sintetizirati u mladim embrijima sjemenki, lišću i plodovima. CK sintetizirani u korijenovom vegetacijskom vrhu prenose se ksilemom u nadzemne dijelove biljke (Lazarević i Poljak, 2019.).

Mikropropagacija uz primjenu CK na hranjivu podlogu za rast brza je biotehnoška metoda za komercijalizaciju važnih usjeva kao što su banane, jabuke, ruže, jagode, krumpir, i očuvanje ugroženih vrsta kao što su *Harpagophytum prucubens* ili *Aloe polyphylla*. Neki od najčešće korištenih CK u mikropropagaciji za rediferencijaciju kalusa u adventivne izdanke su N6-furfuriladenin (kinetin), N6-izopenteniladenin (iP), trans-zeatin (tZ) i N6-benzilaminopurin (BAP) (Plíhal i sur. 2013). Kao jedan od važnih regulatora rasta biljaka potrebnih tijekom kulture biljnog tkiva, CK su uključeni u procese kao što su proizvodnja izdanaka i pigmenta, kao i odgađanje starenja (Aremu i sur. 2012.). Međutim, vrsta i koncentracija CK utječu na fotosintetski potencijal *in vitro* (Aremu i sur. 2012.). Zapravo starenje je proces koji se manifestira kao raspadanje biljnog pigmenta izuzetno je osjetljiv na biljne hormone rasta (uglavnom etilen i CK) (Aremu i sur. 2012.).

Topolini su skupina prirodnih aromatičnih CK, mT i njihovih derivata predložena kod nekoliko biljnih vrsta kao prikladna zamjena za najčešće korištene CK, BAP ili tidazuron za ublažavanje pojava kao što su abnormalnosti grananja, smanjena sposobnost ukorjenjivanja i negativni učinci kod *in vitro* razmnožavanja (Gentile i sur. 2017.). Trenutna upotreba topolina, posebno meta-oblika u kulturi tkiva, je zbog njihove sposobnosti da pospješuju opći rast biljaka i ublažuju različite fiziološke poremećaje (Aremu i sur. 2012.).

2.7.1. Usporedba 6-benzilamonipurina i Meta-topolina

6-benzilaminopurin (BAP) i meta-topolin (mT) su CK koji se koriste u industriji mikropropagacije. Zbog svoje pristupačnosti i učinkovitosti, BAP je najkorišteniji CK, no njegova uporaba ima nekoliko nedostataka (Bairu i sur. 2007.). BAP je važan aromatski CK koji se obično koristi u sustavima mikropropagacije i njegova je učinkovitost opisana za različite vrste. Iako povoljan za proliferaciju, visoke koncentracije ili produljena izloženost CK mogu dovesti do stresnih stanja koja ograničavaju *in vitro* mikropropagaciju zbog razvoja

morfofizioloških bolesti (Werbrouck i sur. 1996.). Werbrouck i sur. (1996.) su utvrdili da mikropropagirana *Spathiphyllum floribundu* nakuplja [9G]BA metabolit u donjem dijelu stabljike. Sporo otpuštanje ovog BAP-a uzrokovalo je heterogenost u rastu i zakorjenjivanju tijekom aklimatizacije (Werbrouck i sur. 1996.). Nekoliko autora (Leshem i sur. 1988; Leshem i Sachs, 1985; Teramoto i sur. 1993.) navodi kako BAP uzrokuje pojavu hiperhidričnosti kod mnogih vrsta. Hiperhidričnost je morfološki poremećaj kod kojeg biljka prekomjerno nakuplja vodu unutar stanica ili tkiva što rezultira prozirnim izgledom (de Souza i sur. 2019.).

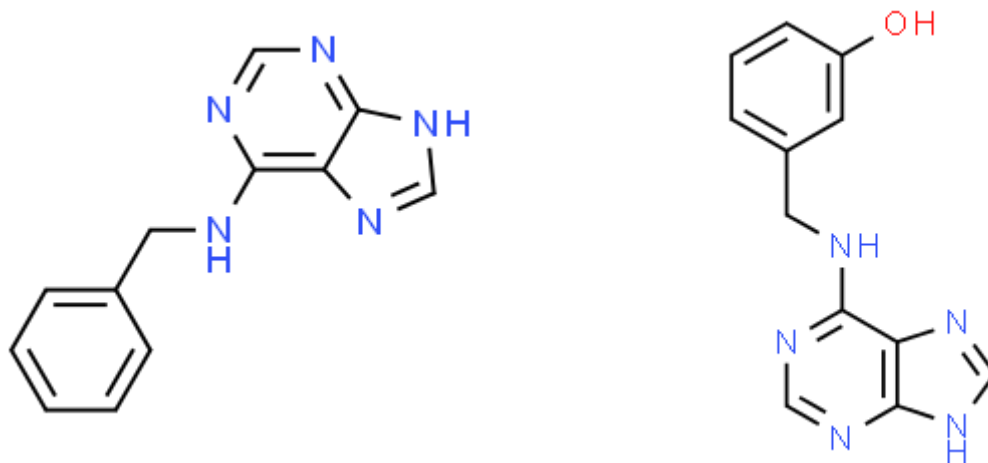
Strnad i sur. (1997.) otkrili su novu obitelj endogenih aromatskih CK baziranih na visoko aktivnom spoju 6-(3-hidroksibenzilamino)purin. Budući da je spoj izvorno pronađen u lišću topole, usvojen je zajednički naziv meta-topolin (mT), koji potječe od češke riječi "topol". Ova nova obitelj regulatora rasta s CK uključuje, osim mT, visoko aktivni prirodni analog BAP-a i mnogo manje aktivni 6-(2-hidroksibenzilamino)purin (ortho-topolin, oT) i njegove metabolite (Strnad, 1997.).

Bairu i sur. (2007.) zaključili su kako je kod *Aloe polyphylla* bolja stopa umnožavanja, spontano ukorjenjivanje i zdravi eksplantati na razini 5,0 mM za tretman mT (kvaliteta koja nije pronađena ni u jednom drugom tretmanu) te je stoga odabrana kao optimalna razina CK. Na toj je razini tretmana mT utvrđena stopa umnožavanja od osam izdanaka (izdanaka dužih od 1,5 cm) po eksplantatu. Pri koncentraciji od 5,0 mM za tretman mT nisu zabilježeni hiperhidrični izdanci.

Učinkovitost mT u formiranju izdanaka *Opuntia stricta* vrhunske morfofiziološke kvalitete bila je evidentna u odnosu na izdanke regenerirane u eksplantatima uzgojenim s BAP-om (de Souza i sur. 2019.).

Gentile i sur. (2014.) su kod sorte Ferdor uzgajanoj na podlozi sa mT dobili izdanke koji su imali veći sadržaj klorofila, uspoređujući sa tretmanima sa BAP-om. To dokazuje da mT ima bolji učinak na odgađanje starenja kod *Prunus* vrsta (Gentile i sur. 2014.).

Gentile i sur. (2017.) zabilježili su najveće umnožavanje izdanaka na mediju s 8,2 μ M mT i utvrđen je ukupni pozitivan učinak mT na rast i kvalitetu mikropropagiranih izdanaka. Pokazalo se da prirodni aromatski CK mT potiče *in vitro* proliferaciju i kvalitetu u izdancima *C. colurna* bez negativnog učinka prijenosa na *in vitro* ukorjenjivanje i *ex vitro* fazu aklimatizacije te da je prikladna alternativa BAP-u. Također uočen je i najbolji učinak mT na fiziološki status izdanaka u *in vitro* uvjetima što se pripisuje visokom sadržaju klorofila, a i niskom oksidativnom stresu izazvanom ovim CK (Gentile i sur. 2017.).



Slika 2.7.1.1. Strukturna formula BAP (lijevo) i mT (desno)

Izvor: <https://www.chemspider.com/>

2.8. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS)

Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) smatraju se nusproizvodima aerobnog metabolizma u biljkama i formiraju se u više staničnih organela kao što su kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi te kod prekomjerne proizvodnje mogu uzrokovati oštećenja DNA koja dovode do smrti stanice (Huang i sur. 2019.). Niske razine ROS-a djeluju kao važne signalne molekule koje reguliraju normalan rast biljaka i reakcije na stres. Potrebne su za odvijanje nekoliko temeljnih bioloških procesa, uključujući proliferaciju i diferencijaciju stanice.

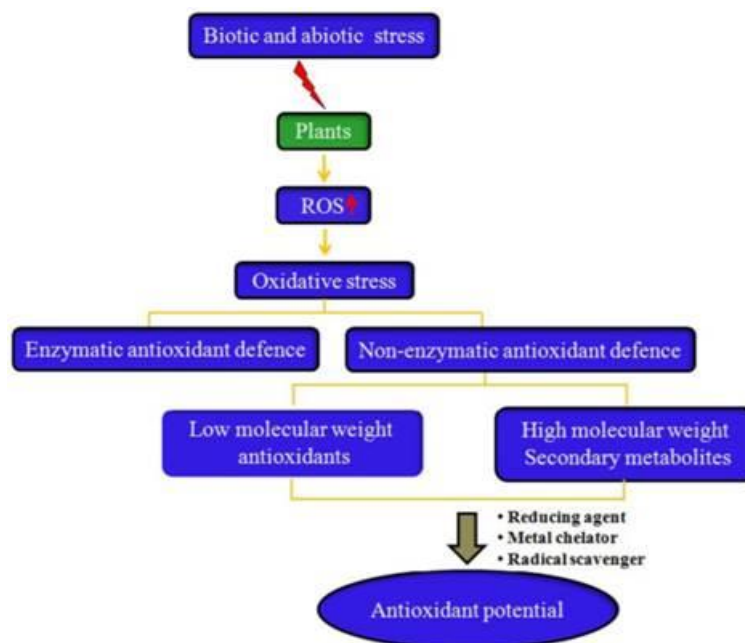
U kulturi biljnog tkiva eksplantati su izloženi mehaničkim oštećenjima, kemikalijama, regulatorima rasta, temperaturi i vlazi. Takvi uvjeti su vrlo štetni za biljku te rezultiraju stvaranjem ROS-a kao što su superoksid ($\cdot\text{O}_2^-$) radikali, vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni (HO) radikali (Elayaraja i sur. 2019.).

Mehanizam obrane od ROS-a se sastoji od mnogih antioksidansa i enzima koji se suprotstavljaju tim ROS spojevima i pretvaraju ih u manje toksične produkte u stanici, ponekad čak i na mjestu njihovog nastanka (Pandey i sur. 2017.). Mehanizmi obrane od ROS-a mogu se svrstati u dvije vrste: enzimski i ne enzimski antioksidativni obrambeni sustavi, koji djeluju interaktivno i sinergistički kako bi neutralizirali slobodne radikale. Enzimski sustavi uglavnom uključuju superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT), peroksidazu (POX) i glutation peroksidazu (GPX) (Huang i sur. 2019.).

2.8.1. Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid-dismutaza (SOD) je najučinkovitiji unutarstanični antioksidacijski enzim prisutan u svim aerobnim organizmima (Antunović, 2013.). SOD su obitelj metaloenzima koji kataliziraju dismutaciju ili disproporcionalnost superoksidnih radikala ($O_2^{\cdot-}$) u molekularni kisik (O_2) i vodikov peroksid (H_2O_2). SOD ima važnu ulogu u fiziologiji biljaka kao rezultat dvostruke uloge ROS-a, kao signala u važnim putovima transdukcije i kao induktora staničnih oštećenja kada se prekomjerno proizvode u visokim koncentracijama. Općenito, abiotički stresovi u biljkama potiču stvaranje ROS-a koji mogu uzrokovati stanična oksidativna oštećenja kada se prekomjerno proizvode u velikim količinama (Slika 2.8.1.1.) (Singh i sur. 2019.). H_2O_2 reagira s raznim stanicama izazivajući oštećenje proteina i DNA uzrokujući peroksidaciju lipida. Taj se H_2O_2 uklanja djelovanjem peroksidaze i katalaze (Rai i sur. 2011.). U biljkama su zabilježene tri vrste SOD-a, a to su Cu-ZnSOD, Fe-SOD i Mn-SOD, s lokalizacijom u citoplazmi, apoplastu, jezgri, kloroplastu i mitohondrijima (Singh i sur. 2019.).

SOD je dobro poznat po svojoj ulozi u rastu i razvoju biljaka te po pružanju tolerancije na uvjete biotičkog i abiotičkog stresa kroz borbu protiv oksidativnog stresa. Enzimi superoksid dismutaze su stabilni i aktivni u širokom rasponu pH i temperatura (Singh i sur. 2019.). Izoenzimi superoksid dismutaze kodirani su u jezgri.



Slika 2.8.1.1. Shema reakcije biljke na stres
Izvor: (<https://www.ijbs.com/v11p0982.htm>)

2.8.2. Peroksidaza (POX)

Peroksidaze su monomerni glikoproteini koji imaju ulogu u kataliziranju oksidacije pojedinih staničnih tvari (npr. fenolnih spojeva, askorbinske kiseline, glutationa i dr.) koristeći vodikov peroksid ili organski hidroperoksid kao supstrat (Gaspar i sur. 1996.).

Prema fiziološkom djelovanju i specifičnosti supstrata postoje dvije skupine peroksidaza. Prvu skupinu čine nespecifične peroksidaze koje uz pomoć vodikovog peroksida prevode različite oksidacijske reakcije koje karakterizira slaba specifičnost supstrata. U ovu skupinu se ubrajaju gvajakol-peroksidaze (GPOX) i pirogalol-peroksidaze (POX) gdje gvajakol, odnosno pirogalol mogu poslužiti kao donori elektrona u uvjetima *in vitro* (Ričko, 2009.). Drugu skupinu sačinjavaju peroksidaze, čija je glavna uloga uklanjanje vodikovog peroksida i organskih hidroperoksida i lipidnih peroksida. U ovu skupinu ubrajamo askorbat-peroksidazu (APOX) i glutation-peroksidazu (GPX) (Antunović, 2013). Glavna zadaća ove skupine je sprječavanje stvaranja visoko reaktivnih slobodnih radikala koji oksidiraju sve stanične komponente i uzrokuju oštećenja stanice. Uz pomoć reducirajućeg supstrata, koji je kod biljaka askorbinska kiselina, peroksidaze reduciraju H_2O_2 u vodu (Ričko, 2009.). Peroksidaze se primjenjuju kao nespecifični pokazatelji stresa na biljku prije pojave vidljivih posljedica kao što su npr. opadanje lišća, kloroza i zaostajanje u rastu (Pandolfini i sur. 1992.).

2.8.3. Ukupni proteini

Proteini su molekule u živim sustavima koje imaju važnu ulogu u svim biološkim procesima. Djeluju kao katalizatori, prenose i pohranjuju druge molekule (kao što je kisik), pružaju mehaničku podršku i imunološku zaštitu, vrše kretanje, prenose živčane impulse i kontroliraju rast i diferencijaciju. Proteini su linearni polimeri sastavljeni od monomernih jedinica zvanih aminokiseline, koje su međusobno povezane. Važno je da se proteini okupljaju u trodimenzionalne strukture, a funkcija proteina izravno ovisi o tim strukturama. Proteini se sastoje od dvadeset različitih bočnih ogranaka koji se međusobno razlikuju po obliku, naboju, sposobnosti stvaranja vodikovih veza, hidrofobnosti i kemijskoj reaktivnosti. Mogu djelovati međusobno ili s drugim biološkim makromolekulama tvoreći složene nakupine. Unutar tih nakupina proteini mogu djelovati sinergistički i stvoriti aktivnosti koje pojedinačni proteini nemaju. Proteini kroz membranu prenose informacije i molekule, a lipidi čine prikladan okoliš za djelovanje tih proteina (Berg i sur. 2013.). Stanične membrane uglavnom sačinjavaju lipidi i proteini (Berg i sur. 2013.).

Topljivost proteina ovisi o raspodjeli polarnih i nepolarnih bočnih ogranaka. Membranski proteini sačinjavaju permeabilne barijere, dok specifični membranski proteini obavljaju sve ostale funkcije membrane (Berg i sur. 2013.). Sastav i količina membranskih proteina uglavnom ovisi o funkciji membrane. Metabolički aktivne, vanjske membrane sadrže crpke, kanale, receptore i enzime (Berg i sur. 2013.). Takve membrane sadržavaju oko 50% proteina.

Membrane za pretvorbu energije, poput membrana mitohondrija i kloroplasta sadrže najviše proteina (do 75%) (Berg i sur. 2013.).

Primarni stresovi kao što su suša, salinitet, temperatura i kemijski zagađivači djeluju na biljke istovremeno uzrokujući oštećenje stanica i sekundarne stresove kao što su osmotski i oksidativni stres (Al-Whaibi, 2011.). S obzirom da biljke ne mogu promijeniti svoj položaj kako bi izbjegle stres, imaju različite načine i mehanizme obrane i morfološke prilagodbe da ga toleriraju. Neki od njih su dominacija sporofita koji obuhvaća osjetljivi gametofit, prisutnost epiderme s pučima za izmjenu plinova, formiranje neaktivnih organa i prisutnost provodnih tkiva za transport na velike udaljenosti (Al-Whaibi, 2011.).

Budući da su proteini izravno uključeni u oblikovanje novog fenotipa prilagodbom fizioloških svojstava izmijenjenom okolišu, njihova uloga u odgovoru biljaka na stres je ključna. Za razliku od genoma koji je statična struktura naslijeđena od roditelja i definira genotip biljke, promjene u biljnom epigenomu, transkriptomu, proteomu i metabolomu oblikuju fenotip biljke kao odgovor na razvojnu i zdravstvenu fazu biljke kao i na okoliš (Kosová i sur. 2018.). Proteini su izravno uključeni u odgovor biljaka na stres i kao strukturni proteini i kao proteini uključeni u regulaciju biljnog epigenoma, transkriptoma i metaboloma. Štoviše, funkcija proteina ne ovisi samo o njegovoj molekularnoj strukturi, već i o njegovoj staničnoj lokalizaciji, posttranslacijskim modifikacijama i partnerima u interakciji (Kosová i sur. 2018.).

Stres uzrokovan temperaturama kao i drugi stresovi mogu pokrenuti neke mehanizme obrane kao što je očigledna ekspresija gena koja nije bila eksprimirana u "normalnim" uvjetima (Al-Whaibi, 2011.). Kao odgovor koji se javlja kod stresa na molekularnoj razini kod svih organizama, posebice kod naglih promjena u ekspresiji genotipa je povećan sastav proteina. Te se skupine nazivaju "proteini toplinskog šoka" (HSPS), "proteini inducibilni stresom" ili "proteini stresa". Gotovo sve vrste stresa induciraju ekspresiju gena i sintezu proteina toplinskog šoka u stanicama pod stresom (Al-Whaibi, 2011.).

2.9. Kapar u kulturi tkiva

Konvencionalne metode razmnožavanja sjemenom neprikladne su za razmnožavanje biljaka kapara iz dva glavna razloga: niske stope klijanja zbog dormantnosti sjemena i ponašanja biljke unakrsnog oprašivanja, što rezultira visokim stupnjem heterozigotnosti u sjemenu. Stoga, uz potrebu povećanja proizvodnje, a prema potrebama poljoprivrednika preferiraju se vegetativno razmnožene sorte kapara (Musallam i sur. 2011.). Konvencionalne metode razmnožavanja kapara pomoću jednogodišnjih reznica imaju nisku sposobnost ukorjenjivanja (55%), dok poluodrvenjele reznice sakupljene i posađene tijekom kolovoza i rujna imaju nisku stopu uspješnosti zakorijenjavanja (30 %) (Sozzi i sur. 2012.). Uz pomoć tehnika mikropropagacije ubrzati će se razmnožavanje, selekcija i očuvanje biljaka kapara (Musallam i sur. 2011.).

In vitro kultura kapara prvi put se spominje 1984. godine korištenjem vegetativnog materijala (Rodriguez i sur. 1990). U kasnijim istraživanjima (Al-Safadi i Elias, 2011; Chalak i sur. 2003;

Chedraoui i Rajjou, 2017; Musallam i sur. 2011; Rodriguez i sur. 1990.) izvijestili su o razmnožavanju počevši uglavnom od nodalnih segmenata. Uzgoj kapra *in vitro* iz nodalnih eksplantata predstavlja probleme koji su uglavnom bili vezani uz uspostavljanje aseptične kulture. *In vitro* zakorijenjavanje je još jedan bitan korak te je nekoliko autora izvijestilo o uspješnom postotku zakorijenjavanja (80-100%). Indukcija zakorijenjavanja zahtjeva visoku razinu auksina koji stimuliraju stvaranje kalusa (Chalak i sur. 2003; Musallam i sur. 2011.). U takvim uvjetima kulture korijenje se moglo inducirati iz stanica kalusa što je neprikladan sustav indukcije korijena za *ex vitro* prijenos, kao što je navedeno za druge vrste (Ricci i sur. 2001.). Štoviše, visoke koncentracije auksina mogu inhibirati rast korijena (El Tahchy i sur. 2011.). Musallam i sur. (2011.) u svom istraživanju na kaparu iznose rezultate kako se WPM pokazao kao najbolji bazalni medij za produljenje izdanaka, broj nodija i listova, nakon čega slijedi modificirani Murashige-Skoog medij ($\frac{1}{2}$ MSD) sa nitratima polovične jačine, ali udvostručene vrijednosti kalcijevog i magnezijevog sulfata (Musallam i sur. 2011.). Kereša i sur. (2019.) u istraživanjuma na kaparu utvrdili su kako pri niskim koncentracijama BAP-a i mT-a ($0,2$ i $0,4$ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) eksplantati proizveli sličan broj izdanaka. Povećanjem koncentracije citokinina povećavale su se razlike u broju izdanaka, pri čemu je mT pri koncentraciji od 0.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mT dosegao 18 izdanaka odnosno dvonodalnih eksplantata.

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

Za ovaj pokus korišteni su izdanci kapara (*Capparis orientalis* Veill.) uzgajani u *in vitro* uvjetima u komori rasta Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pri temperaturi 23,5 °C +/-1 i fotoperiod od 16 sati dan i 8 sati noć. Stoga nije bilo potrebno vršiti ponovnu sterilizaciju biljnog materijala.

3.2. Autoklaviranje i sterilizacija instrumenata

Prije samog procesa mikropropagacije potrebno je sterilizirati potreban materijal i pribor. Prije sterilizacije laboratorijskog posuđa u autoklavu, potrebno ga je oprati vodom i deterdžentom, te isprati destiliranom vodom. Nakon što se posuđe osuši, Magenta posude Petrijeve zdjelice i ostali pribor potrebno je omotati aluminijskom folijom i staviti u autoklav. U autoklavu se vrši sterilizacija pod tlakom pri visokoj temperaturi te se na taj način uklanjaju mikroorganizmi. Cijeli proces sterilizacije traje 25 minuta pri temperaturi od 121°C i tlaku od 1 bar.

Nakon procesa autoklaviranja, Magenta posudice, Petrijeve zdjelice i ostalo posuđe potrebno je premijestiti u sušionik. Prije svakog procesa mikropropagacije i radom s eksplantatima potrebno je dodatno sterilizirati pincete i nožice na otvorenom plamenu. Proces mikropropagacije odvija se u laminaru. Laminar je uređaj koji upuhuje sterilni zrak te na taj način uz sterilizaciju površine i ruku alkoholom omogućuje sterilne uvjete za rad sa eksplantatima.

3.3. Priprema hranjivog medija

U ovom pokusu za multiplikaciju korišten je modificirani „*Woody Plant*“ medij (WPM, Lloyd i McCown, 1980.). Sastav i koncentracije medija prikazane su u Tablici 3.3.1. Ovaj sastav podloge zbog pozitivnih rezultata iz prijašnjih istraživanja u laboratoriju Zavoda za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku, odabran je i u ovom istraživanju.

Pripremljena podloga je sterilizirana u autoklavu 25 minuta pri temperaturi od 121 °C i pri tlaku od 1 bar. Nakon sterilizacije medij je u sterilnim uvjetima u laminaru izlijevan u Magenta posudice. Hormoni rasta dodani su u medij na način da je BAP dodan prije sterilizacije, a mT kasnije. mT je steriliziran i dodan je nakon autoklaviranja iz razloga zato što je termolabilan pri visokim temperaturama i mogao bi utjecati na sastav podloge te se mijenjaju njegova svojstva. pH vrijednost medija optimizirana je na 5,8.

Tablica 3.3.1. Sastav hranjive podloge korištene u pokusu

<i>Sastav</i>	<i>Koncentracija (mg/l)</i>
<i>Makroelementi</i>	
<i>NH₄NO₃</i>	400
<i>CaCl₂ x 2H₂O</i>	95,65
<i>MgSO₄ x 7H₂O</i>	370
<i>KH₂PO₄</i>	170
<i>Ca(NO₃)₂ x 4H₂O</i>	55,95
<i>K₂SO₄</i>	990
<i>FeSO₄ x 7H₂O</i>	5,57
<i>Na₂EDTA x 2H₂O</i>	7,47
<i>Mikroelementi</i>	
<i>CuSO₄ x 5H₂O</i>	0,0025
<i>CoCl₂ x 6H₂O</i>	0,0025
<i>H₃BO₃</i>	0,62
<i>KI</i>	0,083
<i>MnSO₄ x H₂O</i>	1,689
<i>Na₂MoO₄ x 2H₂O</i>	0,025
<i>ZnSO₄ x 7H₂O</i>	0,86
<i>Plant agar</i>	7g/l
<i>Vitamini</i>	
<i>MS vitamini</i>	1 ml
<i>Šećeri</i>	
<i>Saharoza</i>	30 g
<i>Organski dodaci</i>	
<i>Mio-inozitol</i>	0,1 g
<i>Željezo</i>	
<i>Sequestren (helatirano Fe)</i>	0,1305 g

3.4. Multiplikacija izdanaka kapara

Uniformni izdanci kapara su postavljeni na modificirani „Woody plant“ medij (WPM) uz 4 različite koncentracije BAP-a i mT-a (0,5, 1, 2, 4 mg/l) te na kontrolni medij bez regulatora rasta (Tablica 3.4.1.). Svaki od tretmana (kombinacija vrsta citokinina x doza) postavljeni su u 5 Magenta posuda sa 6 izdanaka u svakoj. Dakle, po tretmanu je ukupno postavljeno 30 eksplantata. Sveukupno 45 Magenta posudica uključujući kontrolne varijante.

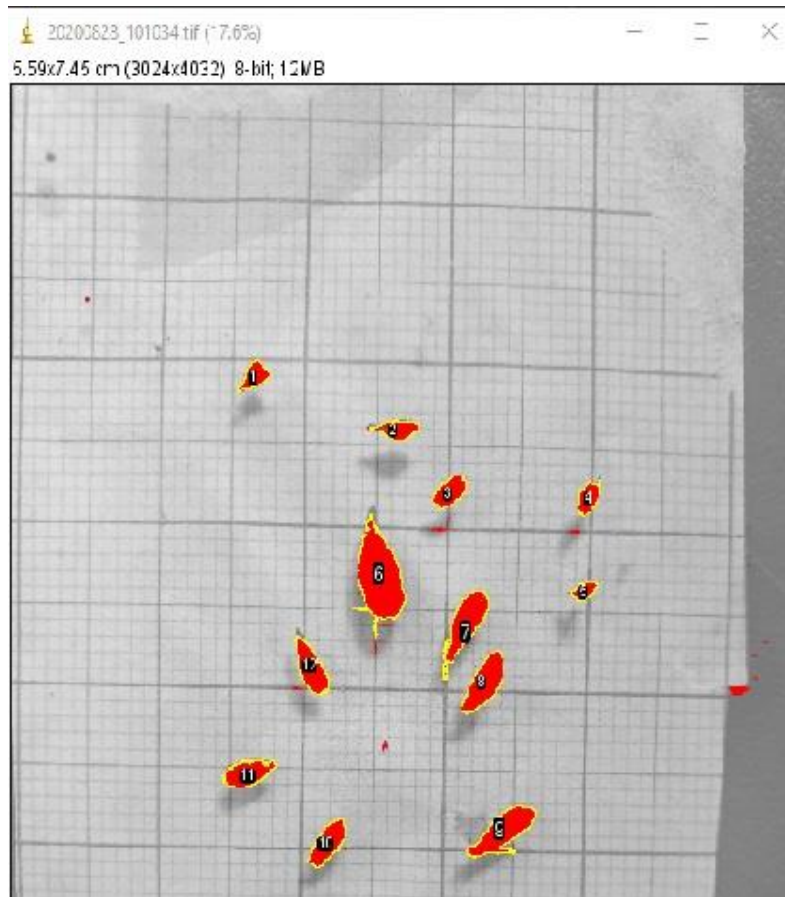
Nakon 40 dana, sa svakog tretmana CK i kontrolnog medija određena je stopa umnožavanja i dužina izdanaka.

Tablica 3.4.1. Tretmani za multiplikaciju izdanaka kapara

<i>Vrsta regulatora rasta</i>	<i>Koncentracija (mg/l)</i>	<i>Kratika medija</i>
mT	0,5	mT 0,5
	1	mT 1
	2	mT 2
	4	mT 4
BAP	0,5	BAP 0,5
	1	BAP 1
	2	BAP 2
	4	BAP 4
bez dodanih citokinina	/	HFM

3.5. Analize fotografija lisne površine

Sa svakog tretmana (kombinacija vrsta citokinina x doza), 40 dana od postavljanja pokusa, su fotografirana tri izdanka iz svake Magenta posude (ukupno 15 izdanaka po tretmanu) te su fotografije analizirane pomoću ImageJ softvera. Pri tom je analizirana lisna površina.



Slika 3.5.1. Mjerenje lisne površine u ImageJ programu

3.6. Mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima i ukupnih membranskih proteina

Sa svakog tretmana (kombinacija vrsta citokina x doza), 40 dana od postavljanja pokusa, su po 2 uzorka biljnog tkiva (ukupno 18 uzoraka) mase 150 mg odvojena i smrznuta te je mjerena aktivnost superoksid-dismutaze, peroksidaze te ukupnih i membranskih proteina.

3.6.1. Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Sadržaj SOD-a je u ovom istraživanju određen spektrofotometrijskom metodom upotrebom nitro-plavog tetrazolijskog klorida (NBT) (Giannopolites i Ries, 1977.). Prisutnost superoksidnih radikala uzrokuje redukciju netopivog NBT-a u formazu plave boje koji je vidljiv na valnoj duljini od 560 nm, što je njegov apsorpcijski maksimum. Ako je SOD prisutan, redukcija NBT-a je inhibirana. Aktivnost SOD-a izražava se kao potrebna količina enzima koji uzrokuju 50% inhibicije redukcije NBT-a pri valnoj duljini od 560 nm uz prisutnost riboflavina na svjetlu.

Prije analize (24h) pripremljen je pufer za ekstrakciju proteina (pH 7,0). Za 50 ml pufera korišteno je 1,538 ml 1 M otopine K_2HPO_4 i 0,963 ml 1 M otopine KH_2PO_4 , dodano je 500 μ l 10 mM EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina) i 49 mg Na-askorbata (44 mg askorbinske kiseline) i nadopunjeno je do 50 ml reH₂O. Dobivena otopina držana je na temperaturi od 4 °C. Također pripremljen je pufer za određivanje sadržaja i aktivnosti SOD-a. Za 200 ml pufera odpipetirano je 9,08 ml 1 M otopine K_2PO_4 i 0,92 1 M otopine KH_2PO_4 , dodano je 2 ml 10 mM EDTA, 0,388 g metionina, 127 mg NBT-a te je nadopunjeno do 200 ml reH₂O. Uz to je otopljen 2%-tni polivinil-polipirolidon (PVPP-veže polifenole koji bi mogli smetati pri reakciji) u deH₂O.

Za određivanje SOD-a izvagana je količina uzorka od 100 mg koja je homogenizirana u 1 ml hladnog pufera za izdvajanje proteina (pH 7,0) i dodano je 200 μ l PVPP-a. Potom je izvršena centrifugacija uzorka u vremenskom periodu od 20 min pri 29 000 x g pri temperaturi od 4 °C (Slika 3.6.1.). Po završetku centrifugiranja uzorci su stavljeni u hladno, a ekstrakt od taloga je izuzet. Za mjerenje SOD-a pomiješan je volumen ekstrakta i pufer za izdvajanje proteina (pH 7,0) ukupnog volumena 0,1 ml. U kivetu je dodano 2,9 ml pufera za mjerenje aktivnosti SOD-a (pH 7,8) i 0,1 ml enzimskog ekstrakta pomiješanog sa puferom te je na kraju dodan riboflavin (2 μ M). Uzorci su zatim pomiješani i stavljeni 10 minuta ispod izvora svjetla. Pokrenuta reakcija bila je zaustavljena zamračivanjem uzoraka. Prije početka očitavanja uzoraka spektrofotometar je podešen na nultu vrijednost mjerenjem apsorbancije (A) slijepe probe pri valnoj duljini od 560 nm. Nakon izvršenog podešavanja na nultu očitane su vrijednosti uzoraka i izrađena je krivulja aktivnosti.



Slika 3.6.1.1. Centrifuga
(Izvor: Dario Srebačić)

3.6.2. Mjerenje aktivnosti peroksidaze (POX)

Mjerenje aktivnosti peroksidaze (POX) određuje se pomoću spektrofotometra. Za potrebno mjerenje peroksidaze pripremljen je 50 mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,0). Za ovaj pufer u tikvicu je odpipetirano 1,538 mL 1 M otopine K_2HPO_4 i 0,936 1 M otopine KH_2PO_4 te je nadopunjeno de H_2O do 50 ml. Sastojci korišteni u puferu za mjerenje aktivnosti POX-a su 50 mM KPpufera, 18 mM gvajakol i 5 mM H_2O_2 . U pufer je dodano 100,65 μ l gvajakola, 25,5 μ 30% H_2O_2 te je nadopunjeno 50 mM KP-puferom (pH 7,0) do 50 ml. U kivetu za određivanje POX-a pipetirano je 950 μ l pufera za mjerenje aktivnosti POX-a te je dodano 10 μ l uzorka kako bi započela reakcija. Porast apsorbancije mjerena je spektrofotometrom svakih 15 minuta s tijekom 2,5 minuta pri valnoj duljini od 470 nm.



Slika 3.6.2.1. Spektrofotometar
(Izvor: Dario Srebačić)

3.6.3. Određivanje koncentracije proteina po Bradford-u

U pripremljenim uzorcima, koncentracija proteina mjerena je spektrofotometrijski prema Bradford-u (1976). Metoda po Bradford-u temelji se na brzom pomaku maksimuma apsorbancije u valnoj duljini od 465 nm na 595 nm. Taj pomak javlja se u trenutku kada Coomassie briljant G-250 (eng Coomassie Brilliant Blue) poprima plavu boju u kiseljoj otopini i veže se na bočne ogranke aminokiselina pri čemu se boja otopine mijenja iz zelenkaste u

plavu. Smatra se kako se sulfatne grupe u kiseloj sredini (otopini) pomoću elektrostatskih sila bolje vežu s aminokiselinskim polipeptidnim ostacima. Određivanje proteina vršeno je na valnoj duljini pri 595 nm. Iz svakog pojedinog uzorka, koncentracija proteina ekstrapolirana je iz standardne krivulje te je dobivena mjerenjem apsorbancije niza razrijeđenog goveđeg albuminskog seruma (BSA, eng. Bovine serum albumin).

U laboratorijsku čašu dodano je 50 ml 95%-tnog etilnog alkohola, 100 ml 85%-tne fosforne kiseline, 100 mg Coomassie briljant plavo G-250 i destilirana voda do 1000 ml. Nakon dobivene razrijeđene BSA otopine za standardnu krivulju, pripremljena je slijepa proba koja se sastojala od 100 µl deH₂O i pufera u kojem su pripremani uzorci. Prije mjerenja količine proteina, uzorci su razrijeđeni 10 puta i potom pipetirani po 100 µl u kivete. Zatim se u kivetu pipetiralo i izmiješalo 1 ml Bradfordova reagensa. Nakon što je uzorak odstajao 5 min pri sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija pri 595 nm prema slijepoj probi kojoj je dodan reagens.

3.7. Statistička analiza

Za usporedbu duljine, broja izdanaka te lisne površine na ispitivanim tretmanima korištene su prosječne vrijednosti.

Za usporedbu aktivnosti peroksidaze, superoksid-dismutaze te koncentracije proteina ovisno o tretmanima korištena je analiza varijance (ANOVA) i Bonferroni test. Analize su provedene pomoću SAS verzije 9.1.

4. Rezultati i rasprava

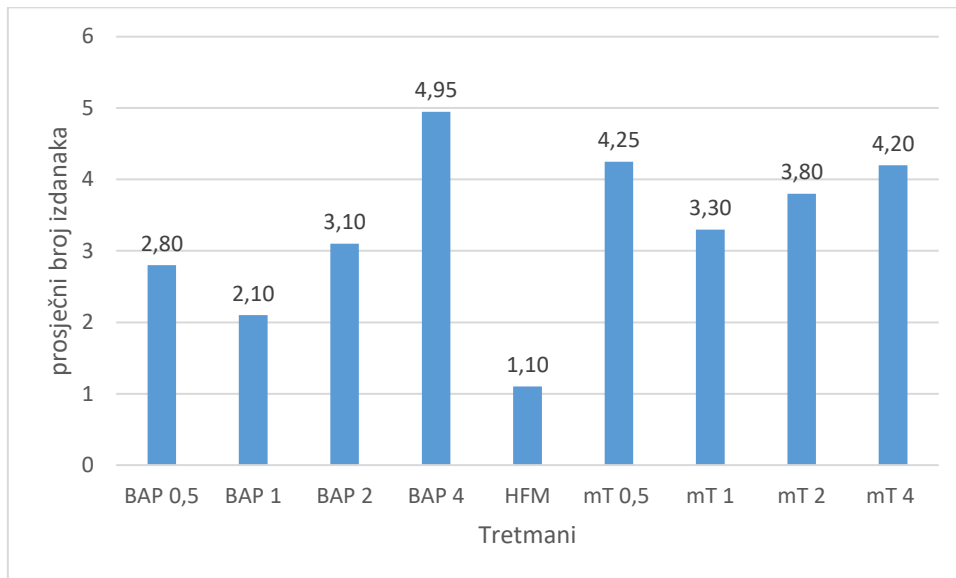
4.1. Učinak vrste i doze citokinina na stopu multiplikacije

Nakon 40 dana od postavljanja eksplantata na hranidbeni medij sa različitim koncentracijama BAP-a i mT-a, u svrhu multiplikacije mjerena je prosječna duljina izdanaka (mm) i prosječni broj formiranih izdanaka. U Grafovima 4.1.1. i 4.1.2. prikazani su podaci za prosječnu duljinu (mm) i broj izdanaka svakog tretmana CK (BAP i mT) i kontrolnog tretmana bez dodanih CK. Za svaki tretman navedena svojstva mjerena su zasebno.

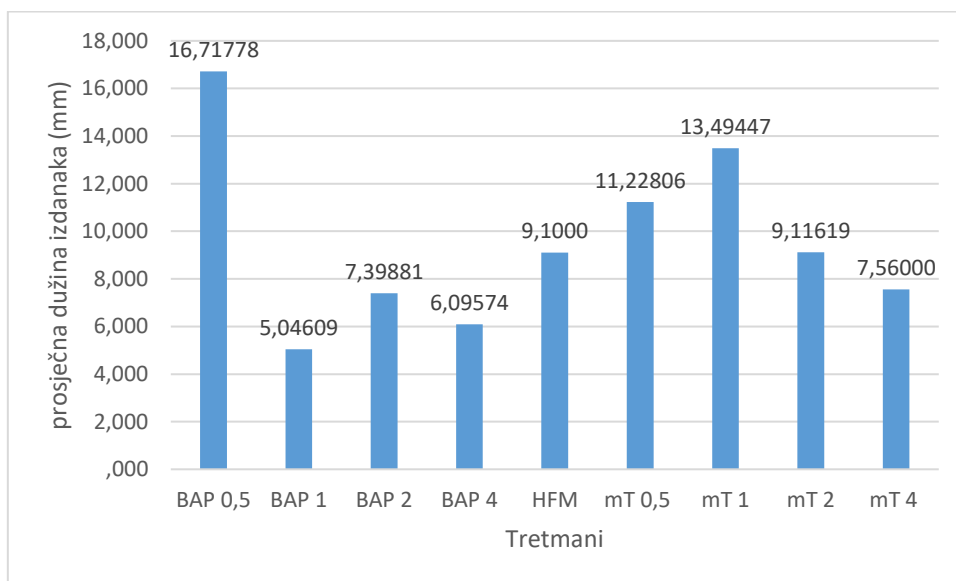
U ovom istraživanju, na svakom od testiranih CK razvijen je veći broj izdanaka nego na kontrolnom tretmanu bez dodatka CK. Pri najvišoj koncentraciji BAP-a (4 mg/l) utvrđen je najveći prosječni broj formiranih izdanaka (4,95). Sa smanjenjem koncentracije BAP-a, smanjivao se i broj izdanaka po tretmanu, dok je pri istoj koncentraciji mT-a (4 mg/l) prosječno formirano 4,2 izdanaka. Kod mT-a je podjednak broj izdanaka formiran pri najvišoj i najnižoj koncentraciji od (4,2 izdanaka na 4 mg/l odnosno 4,25 izdanaka na tretmanu s 0,5 mg/l). Bairu i sur. (2007.) navode kako je kod niskih koncentracija BAP-a ostvarena veća stopa multiplikacije. Kako se koncentracija CK povećavala, veći broj izdanaka uočen je kod tretmana sa mT što je u našem istraživanju suprotno. Također, Kereša i sur. (2019.) pri niskim koncentracijama CK dobili su slične rezultate našem istraživanju za broj i duljinu izdanaka po eksplantatu te utvrdili da s povećanjem koncentracije, povećavale su se i razlike u broju formiranih izdanaka. Werbrouck i sur. (1996.) navode kako među četiri vrste testiranih CK, među kojima su BAP i mT, nema značajne razlike u broju izdanaka. S druge strane, Kaur i sur. (2021.) u istraživanju na biljnoj vrsti *Withania somnifera* navode kako je najveći broj izdanaka utvrđen kod tretmana BAP-om (10 μ M).

Prosječna duljina izdanaka razvijenih na kontrolnom tretmanu bez dodatka CK iznosila je 9,1 mm. U usporedbi s tim tretmanom, izdanci veće prosječne duljine razvijeni su na tretmanu s najmanjom koncentracijom BAP-a (0,5 mg/l), a to je 16,72 mm. Na tretmanima s većim koncentracijama BAP-a prosječna duljina izdanaka je bila manja nego na kontrolnom tretmanu. Iz ovih rezultata vidljivo je da male količine BAP-a utječu na stvaranje najdužih izdanaka te kako se s povećanjem koncentracije dužina izdanaka smanjuje. Uspoređujući tretmane mT sa BAP-om, vidljiv je sličan trend. Najveća prosječna duljina izdanaka kod tretmana mT-om utvrđena je pri koncentraciji 1 mg/l. Povećanjem koncentracije mT, kao i kod BAP-a, prosječna duljina izdanaka se smanjuje.

Gentile i sur. (2017.) u istraživanju *C. colurna* utvrdili su duže izdanke pri višim koncentracijama mT u odnosu na BAP.



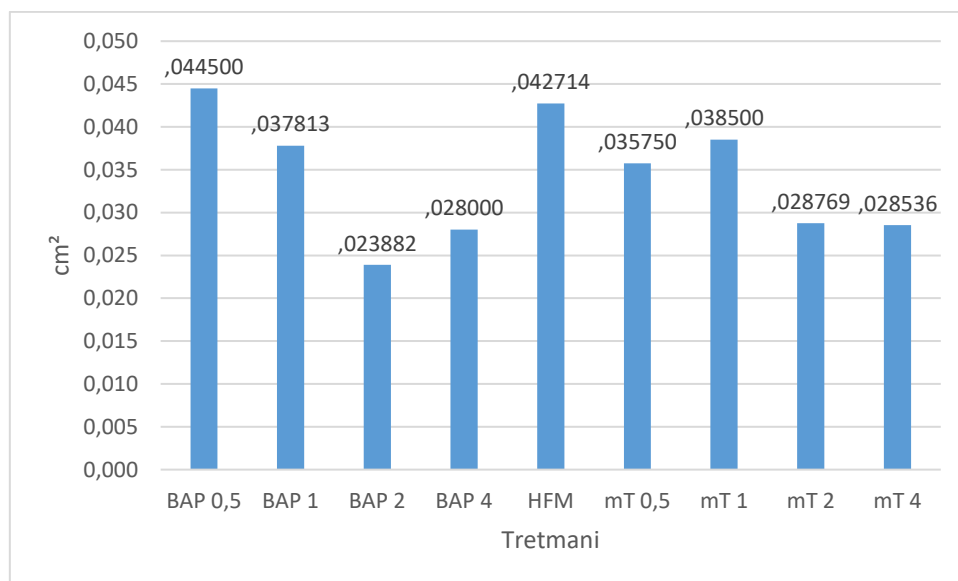
Grafikon 4.1.1. Prosječni broj izdanaka po tretmanima



Grafikon 4.1.2. Prosječna dužina izdanaka (mm)

4.2. Učinak vrste i doze citokinina na lisnu površinu

Grafikon 4.2.1. prikazuje prosječne vrijednosti lisne površine po tretmanu mjerene imageJ programom. Najviša prosječna lisna površina zabilježena je kod tretmana BAP-om u koncentracijama od 0,5 mg/l. Također najmanja prosječna lisna površina utvrđena je kod tretmana BAP-om u koncentraciji od 2 mg/l. Kod tretmana mT vidljivo je kako su prosječne vrijednosti lisne površine približno iste. Najviša prosječna lisna površina kod tretmana mT zabilježena je pri koncentraciji od 1 mg/l, dok je pri koncentracijama od 2 i 4 mg/l najmanja. Iz grafikona je vidljivo da je tretmani s manjom koncentracijom CK i kontrolni tretman bez dodatka CK daje približno jednaku lisnu površinu. Odnosno, niske doze CK, bilo mT bilo BAP-a ne utječu negativno na smanjenje lisne površine. S povećanjem koncentracije CK, lisna površina se smanjuje. Taj trend vidljiv je i kod tretmana s oba istraživana CK. CK kontroliraju veličinu lista regulirajući diobu i rast stanica lisnog tkiva. Tijekom faze diobe stanica lista, CK, zajedno s auksinom, aktiviraju proliferaciju stanica. Istraživanje stanične kulture sa stanicama u suspenziji pokazala je da se stanična dioba zaustavlja bez auksina i da dodavanje auksina u zaustavljenoj staničnoj kulturi obnavlja aktivnost stanične diobe, sugerirajući da auksin daje potreban signal koji omogućuje stanicama da uđu u stanični ciklus (Wu i sur. 2021.). Međutim, CK skraćuju prijelaz između bilo koje dvije faze staničnog ciklusa i produžuju razdoblje stanične proliferacije odgađanjem početka stanične diferencijacije (Wu i sur. 2021.). Razumijevanje odnosa biljnih hormona i razvoja lišća važno je za kulturu biljnog tkiva i omogućit će novi uvid u razvoj biljaka. Stoga su potrebna usmjerena istraživanja o mehanizmima djelovanja CK i njihovim sinergističkim interakcijama s drugim hormonima kako bi se unaprijedilo naše razumijevanje razvoja lista (Wu i ostali, 2021).



Grafikon 4.2.1. Prosječne vrijednosti lisne površine (cm²) ovisno o tretmanu

4.3. Učinak vrste i doze citokinina na razinu aktivnosti hormona stresa te razinu ukupnih proteina

Tablica 4.3.1. Analiza varijance (ANOVA) za SOD, POX i ukupne proteine

<i>Svojstvo</i>	<i>Prosječni kvadrat</i>	<i>Signifikantnost</i>
<i>SOD</i>	199,873	0,035*
<i>POX</i>	0,0000028	< 0,0001***
<i>PROTEINI</i>	0,0113	0,005**

*F vrijednost signifikantna kod $p < 0,05$

**F vrijednost signifikantna kod $p < 0,01$

*** F vrijednost signifikantna kod $p < 0,001$

U tablici 4.3.1. prikazani se rezultati analize varijance za aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i peroksidaze (POX) te sadržaj ukupnih proteina, u listu kapara na hranjivoj podlozi sa različitim koncentracijama CK. Analiza varijance ukazuje na postojanje statistički značajne razlike pri različitim koncentracijama CK kod svih mjerenih svojstava.

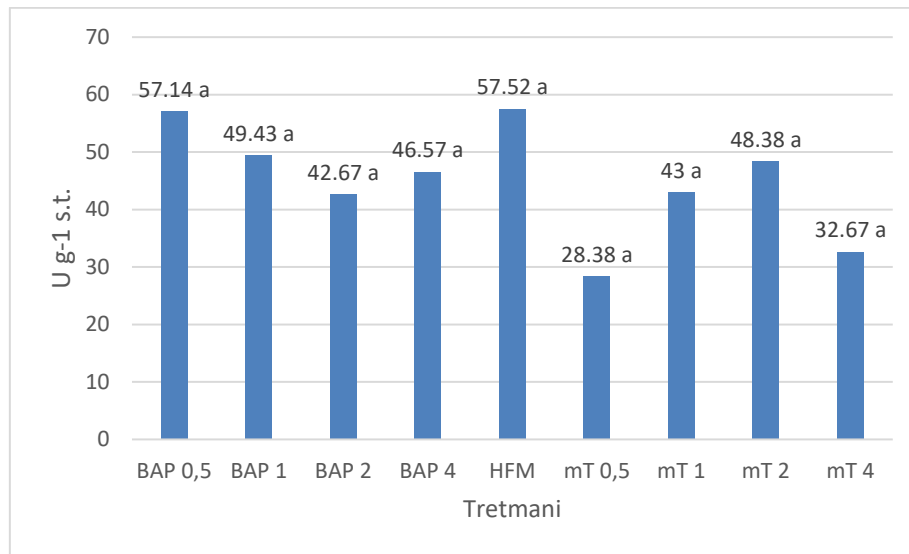
4.4. Učinak vrste i doze citokinina na razinu aktivnosti hormona stresa te razinu ukupnih proteina

4.4.1. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD)

Grafikon 4.4.1.1. Prikazuje aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima kapara sa različitim koncentracijama CK. Najviša koncentracija SOD-a zabilježena je kod hormon free tretmana. Najviša aktivnost SOD-a kod tretmana BAP-om zabilježena je pri koncentraciji od 0,5 mg/l, dok kod tretmana mT je pri koncentraciji od 2 mg/l. Kod tretmana BAP-om, aktivnost SOD-a se smanjuje povećanjem koncentracije od 0,5 do 2 mg/l da bi se na tretmanu s 4 mg/l lagano povisila. Suprotno tome, kod tretmana mT imamo slučaj povećanja aktivnosti SOD-a povećanjem koncentracije CK od 0,5 do 2 mg/l da bi na tretmanu s 4 mg/l mT došlo do smanjenja aktivnosti SOD-a. Pomoću statističke analize utvrđeno je da nema signifikantne razlike između tretmana.

Naaz i sur. (2019.) u istraživanju na *Syzygium cumini* su pratili aktivnost antioksidacijskih enzima na biljkama regeneriranim u tretmanima s mT i BAP-om. Utvrdili su kako se biljkama regeneriranim na tretmanima mT i BAP-om jednakom stopom povećava aktivnost SOD-a u fazi aklimatizacije od nultog do 35-og dana nakon sadnje u *ex vitro* uvjetima. Autori sugeriraju da biljke kojima se povećava aktivnost antioksidacijskih enzima za vrijeme aklimatizacije uspješnije prevladavaju stresne uvjete.

Sukladno rezultatima koje su dobili Naaz i sur. (2019.) niti u našem istraživanju Bonferronijevim testom nije utvrđena značajna razlika u aktivnosti superoksid dismutaze ovisno o tretmanu CK. Iako ne postoje statistički značajne razlike, na tretmanima s BAP-om su izmjerene nešto više razine aktivnosti SOD-a u odnosu na tretmane mT-om. Također, Aremu i sur. (2013.) su u istraživanju na *Merwillia plumbea* utvrdili su kako nema značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti izdanaka regeneriranih na BAP-u i na mT-u.



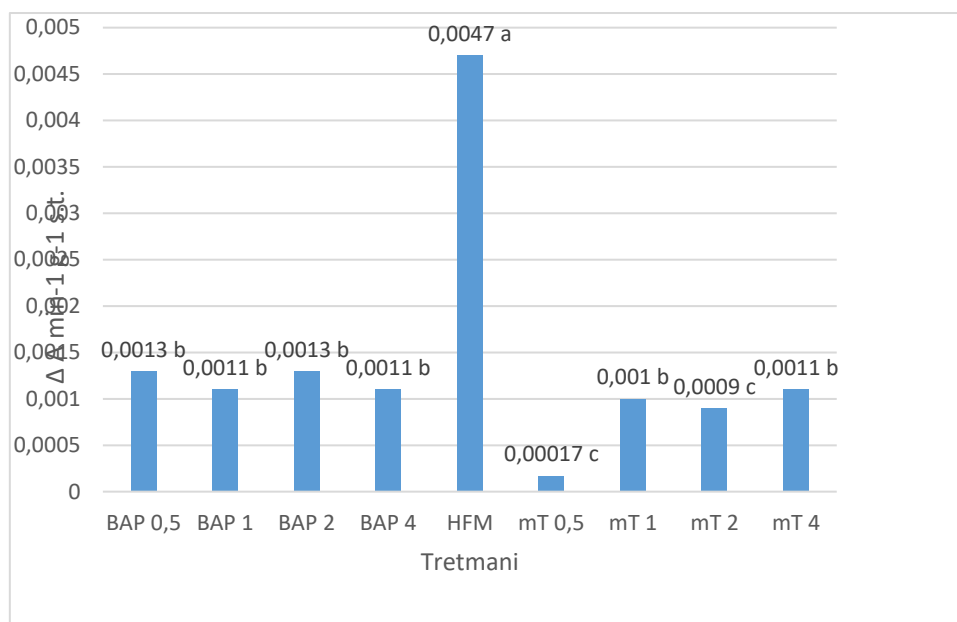
Grafikon 4.4.1.1. Aktivnost superoksid dismutaze (jedinice po gramu suhe tvari) u uzorcima kapara ovisno o tretmanu citokininima

4.4.2. Aktivnost peroksidaze (POX)

Grafikon 4.4.2.1. prikazuje aktivnost peroksidaze u uzorcima kapara. Najviša koncentracija POX-a zabilježena je kod kontrolnog tretmana. Uz to, aktivnost peroksidaze izmjerena na kontrolnom mediju je značajno veća od aktivnosti izmjerene na bilo kojem drugom tretmanu.

Aktivnost POX-a je bila signifikantno najniža kod tretmana mT 0,5 i mT 2.

Naaz i sur. (2019.) u istraživanju na *Syzygium cumini* utvrdili su veću aktivnost peroksidaze kod biljaka koje potječu s tretmana mT na aklimatizaciji nultog dana u odnosu na biljke koje potječu s tretmana BAP-om. Međutim, u narednim mjerenjima nije bilo značajne razlike u aktivnosti POX-a ovisno o tretmanima CK.



Grafikon 4.4.2.1. Aktivnost peroksidaze (jedinice po gramu suhe tvari) u uzorcima kapara

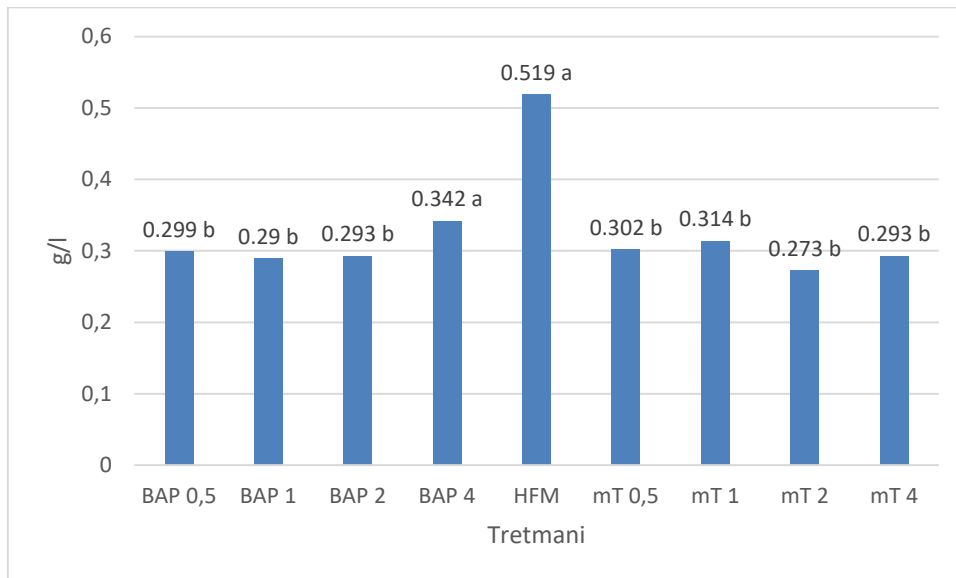
4.4.3. Ukupni sadržaj topivih proteina

Grafikon 4.4.3.1. prikazuje sadržaj ukupnih proteina u uzorcima kapara. Značajno najveći sadržaj ukupnih proteina zabilježen je kod kontrolnog tretmana i tretmana sa najvišom koncentracijom BAP-a (4 mg/l). Sadržaj ukupnih proteina bilo je podjednak na svim ostalim tretmanima sa BAP-om i mT-om.

Poznato je da CK imaju ulogu u rastu i razvoju biljaka, ali relativno nedavno je otkrivena i njihova uloga u odgovoru na biotski i abiotski stres. Dok neki autori govore da povećana razina endogenih CK povećava otpornost na abiotski stres primjerice suše, drugi izvještavaju da reducirana razina CK dovodi do povećanja otpornosti biljaka (Kuppu i sur. 2013; Tran i sur. 2007.). Naime, biljke trebaju naći ravnotežu u kojoj će stopa rasta dozvoliti kompletan životni ciklus s minimalnom akumulacijom oštećenih staničnih komponenti koje dovode do stanične smrti. Ovo prilagođavanje resursa može dovesti do inhibicije rasta uzrokovane stresom koja je praćena redukcijom proizvodnje proteina (Karunadasa i sur. 2020.).

Karunadasa i sur. (2020.) daju pregled istraživanja koja pokazuju da tretman CK dovodi do povećane sinteze proteina. Uz to, autori dokazuju da nakon tretmana CK, do povećanja sinteze proteina dolazi unutar 1 sata. Sintezu proteina povezuju s indukcijom gena RPL4A i RPL4D koji kodiraju esencijalne komponente ribosoma (Karunadasa i sur. 2020.).

Chen i sur. (2019.) u istraživanju na biljci *Artemisia halodendron* su utvrdili kako se sadržaj proteina povećava sa intenzitetom suše. Također, rezultati koje su dobili Sadeghi i Rostami (2017.) na kaparu u sušnim uvjetima, utvrdili su povećanje ukupnih proteina tijekom sušnog perioda.



Grafikon 4.4.3.1. Sadržaj ukupnih proteina (g/l) kapara ovisno o tretmanu citokininima

5. Zaključak

Ciljevi ovog rada bili su odrediti učinak vrste i doze CK na stopu multiplikacije te odrediti lisnu površinu i razinu aktivnosti enzima stresa i ukupnih proteina u izdancima kapara u *in vitro* uvjetima s obzirom na korištenu vrstu i dozu CK. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da:

- Koncentracija CK utječe na dužinu i broj izdanaka, kao i na lisnu površinu.
- Na svakom od testiranih CK razvijen je veći broj izdanaka nego na kontrolnom tretmanu bez dodatka CK. Uspoređujući rezultate dvaju korištenih CK (mT i BAP) u istraživanju, zaključeno je da su tretmani sa najvišom koncentracijom BAP-a proizveli najviše izdanaka, dok su tretmani sa najnižom koncentracijom BAP-a proizveli najduže izdanke.
- Niske doze CK (0,5 i 1 mg/l) bilo mT bilo BAP-a ne utječu negativno na smanjenje lisne površine. S povećanjem koncentracije CK, lisna površina se smanjuje. Taj trend vidljiv je kod oba istraživana CK.
- Najveća razina aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid dismutaze i peroksidaze zabilježena je kod kontrolnog tretmana. Kod mjerenja aktivnosti peroksidaze statističkom analizom utvrđena je signifikantna razlika između kontrolnog tretmana i tretmana s dodatkom CK.
- Najviši sadržaj ukupnih proteina u uzorcima kapara je također zabilježen kod HFM tretmana, koji se signifikantno razlikuje od ostalih tretmana, izuzev tretmana s 4 mg/l BAP-a.

6. Literatura

1. Afsharypuor, S., Jeiran, K., Jazy, A.A., 1998. First investigation of the flavour profiles of the leaf, ripe fruit and root of *Capparis spinosa* var. *mucronifolia* from Iran. *Pharm. Acta Helv.* 72, 307–309.
2. Al-Safadi, B., Elias, R. 2011. Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) propagation using in vitro culture and gamma irradiation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 127, 290–297.
3. Al-Whaibi, M.H. 2011. Plant heat-shock proteins: A mini review. *J. King Saud Univ. - Sci.* 23, 139–150.
4. Antunović, J. 2013. Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L.) uzgojenih pri slabom i jakom osvjetljenju. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
5. Aremu, A.O., Bairu, M.W., Szüčová, L., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2012. The role of meta-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated „Williams“ bananas. *J. Plant Physiol.* 169, 1530–1541.
6. Aremu, A.O., Gruz, J., Šubrtová, M., Szüčová, L., Doležal, K., Bairu, M.W., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2013. Antioxidant and phenolic acid profiles of tissue cultured and acclimatized *Merwillia plumbea* plantlets in relation to the applied cytokinins. *J. Plant Physiol.* 170, 1303–1308.
7. Bairu, M.W., Stirk, W.A., Doležal, K., Van Staden, J. 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. Tissue Organ Cult.* 90, 15–23.
8. Carra, A., Sajeva, M., Abbate, L., Carimi, F. 2012. In vitro plant regeneration of caper (*Capparis spinosa* L.) from floral explants and genetic stability of regenerants 373–381.
9. Chalak, L., Elbitar, A., Cordahi, N., Hage, C., Chehade, A. 2003. In vitro propagation of *Capparis spinosa*. *Acta Hortic.*
10. Chedraoui, S., 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, 1–18.
11. Chen, J., Zhao, X., Zhang, Y., Li, Y., Luo, Y., Ning, Z., Wang, R., Wang, P., Cong, A. 2019. Effects of drought and rehydration on the physiological responses of *Artemisia halodendron*. *Water (Switzerland)* 11, 1–13.
12. de Souza, L.M., Ribeiro Barbosa, M., Zárate-Salazar, J.R., Lozano-Isla, F., Rangel Camara, T. 2019. Use of meta-Topolin, an unconventional cytokinin in the in vitro multiplication of *Opuntia stricta* Haw. *Biotechnol. Veg.* 19, 85–97.
13. El Tahchy, A., Bordage, S., Ptak, A., Dupire, F., Barre, E., Guillou, C., Henry, M., Chapleur, Y., Laurain-Mattar, D. 2011. Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of *Amaryllidaceae*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 106, 381–390.
14. Elayaraja, D., Subramanyam, K., Vasudevan, V., Link, I. 2019. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Meta-Topolin (mT) enhances the in vitro regeneration frequency of *Sesamum indicum* (L.). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 21, 101320.
15. Francesca, N., Barbera, M., Martorana, A., Saiano, F., Gaglio, R., Aponte, M., Moschetti, G., Settanni, L. 2016. Optimised method for the analysis of phenolic compounds from caper (*Capparis spinosa* L.) berries and monitoring of their changes during fermentation. *Food Chem.* 196, 1172–1179.

16. Gaspar, T., Keveks, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M., Thorpe, T.A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 32, 272–289.
17. Gentile, A., Frattarelli, A., Nota, 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. Tissue Organ Cult.* 128, 693–703.
18. Gentile, A., Jàquez Gutiérrez, M., Martínez, J., Frattarelli, A., Nota, P., Caboni, E. 2014. Effect of meta-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 118, 373–381.
19. Švicarska.
20. Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977). Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314.
21. Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.X., Yi, M., Zhao, Y. 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Front. Plant Sci.* 10, 1–10.
22. Hussain, A., Qarshi, I.A., Nazir, H., Ullah, I. 2012. *Plant Tissue Culture : Current Status and Opportunities* 1–28.
23. IAEA 2004. Low cost options for tissue culture technology in developing countries 26–30.
24. Inocencio, C., Rivera, D., Obón, M.C., Alcaraz, F., Barreña, J.A. 2006. A systematic revision of *Capparis* section *Capparis* (Capparaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 93, 122–149.
25. Jelaska S. (1994). *Kultura biljnih stanica i tkiva, temeljna istraživanja i primjena.* Školska knjiga, Zagreb
26. Karunadasa, S.S., Kurepa, J., Shull, T.E., Smalle, J.A. 2020. Cytokinin-induced protein synthesis suppresses growth and osmotic stress tolerance, *New Phytologist*.
27. Kaur, Kuldeep, Kaur, Kulwinder, Bhandawat, A., Pati, P.K. 2021. In vitro shoot multiplication using meta-Topolin and leaf-based regeneration of a withaferin A rich accession of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Ind. Crops Prod.* 171, 113872
28. Kereša, S., Stanković, D., Lodeta, K.B., Jerčić, I.H., Bolarić, S., Barić, M., Mihovilović, A.B. 2019. Efficient protocol for the in vitro plantlet production of caper (*Capparis orientalis* Veill.) from the east adriatic coast. *Agronomy* 9.
29. Khanam, M.N., Javed, S. Bin, Anis, M., Alatar, A.A. 2020. meta-Topolin induced in vitro regeneration and metabolic profiling in *Allamanda cathartica* L. *Ind. Crops Prod.* 145.
30. Kieber, J.J., Schaller, G.E. 2014. Cytokinins. *Arab. B.* 12, e0168.
31. Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M.O., Prášil, I.T., Renaut, J. 2018. Plant abiotic stress proteomics: The major factors determining alterations in cellular proteome. *Front. Plant Sci.* 9, 1–22.
32. Kovačević, R. (2014). *Mediterranski vrt. Cvijet kapara.* [online] Izvor: <https://www.slideshare.net/AMER9437/mc-27>
33. Kulisic-Bilusic, T., Blažević, I., Dejanović, B., Miloš, M., Pifat, G. 2010. Evaluation of the antioxidant activity of essential oils from caper (*Capparis spinosa*) and sea fennel (*Crithmum maritimum*) by different methods. *J. Food Biochem.* 34, 286–302.
34. Kulisic-Bilusic, T., Schmöller, I., Schnäbele, K., Siracusa, L., Ruberto, G. 2012. The anticarcinogenic potential of essential oil and aqueous infusion from caper (*Capparis spinosa* L.). *Food Chem.* 132, 261–267.
35. Kuppuppu, S., Mishra, N., Hu, R., Sun, L., Zhu, X., Shen, G., Blumwald, E., Payton, P., Zhang, H. 2013. Water-Deficit Inducible Expression of a Cytokinin Biosynthetic Gene IPT Improves Drought Tolerance in Cotton. *PLoS One* 8.

36. Kuštrak D. (2014). Morfološka I mikroskopska analiza začina. Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb.
37. Landsky i sur. 2014. Caper The Genus Capparis.
38. Lazarević, B., Poljak, M. 2019. Fiziologija bilja. Zagreb.
39. Leshem, B., Sachs, T. 1985. „vitrified“ *Dianthus-teratomata* in vitro due to growth factor imbalance. *Ann. Bot.* 56, 613–617.
40. Leshem, B., Shaley, D.P., Izhar, S. 1988. Cytokinin as an inducer of vitrification in melon. *Ann. Bot.* 61, 255–260.
41. Grlić, Lj. 2005. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, Treće izda. ed. Ex Libris, Rijeka.
42. M. Berg, J., L. Tymoczko, J., Styer, L. 2013. Biokemija, 1. izdanje. ed. Školska knjiga, Zagreb.
43. Marković, Z., Preiner, D. 2011. Biotehnologija u vinogradarstvu.
44. Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., Von Saltza, M.H., Strong, F.M. 1956. Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1375–1380.
45. Muhaidat, R., Al-Qudah, M.A., Al-Shayeb, A., Jacob, J.H., Al-Jaber, H.I., Hussein, E., Al-Tarawneh, I.N., Abu Orabi, S.T. 2013. Chemical profile and antibacterial activity of crude fractions and essential oils of *Capparis ovata* Desf. and *Capparis spinosa* L. (Capparaceae). *Int. J. Integr. Biol.* 14, 39–47.
46. Musallam, I., Duwayri, M., Shibli, R.A. 2011. Micropropagation of Caper (*Capparis spinosa* L.) from Wild Plants. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* 5, 17–21.
47. Naaz, A., Hussain, S.A., Anis, M., Alatar, A.A. 2019. Meta-topolin improved micropropagation in *Syzygium cumini* and acclimatization to ex vitro conditions. *Biol. Plant.* 63, 174–182.
48. Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y.K., Arora, S., Reddy, M.K. 2017. Abiotic stress tolerance in plants: Myriad roles of ascorbate peroxidase. *Front. Plant Sci.* 8, 1–13.
49. Pandolfini, T., Gabrielli, R., Comparini, C., 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant. Cell Environ.* 15, 719–725.
50. 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 Signal. Behav.* 8, 1–4.
51. Rai, M.K., Kalia, R.K., Singh, R., Gangola, M.P., Dhawan, A.K. 2011. Developing stress tolerant plants through in vitro selection — An overview of the recent progress. *Environ. Exp. Bot.* 71, 89–98.
52. Ricci, A., Carra, A., Torelli, A., Maggiali, C.A., Morini, G., Branca, C. 2001. Cytokinin-like activity of N,N'-diphenylureas. N,N'-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and N,N'-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious root formation in apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). *Plant Sci.* 160, 1055–1065.
53. Ričko, N. 2009. Utjecaj cinka na kadmijem uzrokovane promjene u rastu i aktivnosti antioksidacijskih enzima u vodenoj leći. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
54. Rodriguez, R., Cuozzo, M.R., Ancora, G. 1990. In vitro propagation of Caper (*Capparis spinosa* L.).
55. Sadeghi, H., Rostami, L. 2017. Changes in biochemical characteristics caper seedlings. *J. Agriculture Rural development in the tropics and subtropics.* 118 (2) p 199-206.13803479.pdf 118, 199–206.

56. Sakakibara, H. 2006. Cytokinins : Activity , Biosynthesis , and Translocation 431–449.
57. Sher, H., Alyemeni, M.N. 2010. Ethnobotanical and pharmaceutical evaluation of *Capparis spinosa* L, validity of local folk and unani system of medicine. *J. Med. Plants Res.* 4, 1751–1756.
58. Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K. 2002. Renormalization approach to quantum-dot structures under strong alternating fields. *J. Exp. Bot.* 53.
59. Singh, S.P., Upadhyay, S.K., Pandey, A., Kumar, S. 2019. *Molecular Approaches in Plant Biology and Environmental Challenges, Energy, Environment, and Sustainability.*
60. Sozzi, G.O., Peter, K. V., Nirmal Babu, K., Divakaran, M. 2012. *Capers and caperberries, Second Edi. ed, Handbook of Herbs and Spices: Second Edition.* Woodhead Publishing Limited.
61. Strnad, M. 1997. The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* 101, 674–688.
62. Teramoto, H., Momotani, E., Tsuji, H. 1993. Benzyladenine-induced changes in the translatable mRNA population in excised cucumber cotyledons. *Physiol. Plant.* 87, 584–591.
63. Thorpe, T.A. 1990. The current status of plant tissue culture, *Developments in Crop Science.* Elsevier Science Publishers B.V.
64. Thorpe, T.A. 2012. Chapter 2 History of Plant Tissue Culture. *Methods Mol. Biol.*
65. Tlili, N., Elfalleh, W., Saadaoui, E., Khaldi, A., Triki, S., Nasri, N. 2011. The caper (*Capparis* L.): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties. *Fitoterapia* 82, 93–101.
66. Tran, L.P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-shinozaki, K. 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis* 3–8.
67. Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61, 199–223.
68. Werbrouck, S.P.O., Strnad, M., Van Onckelen, H.A., Debergh, P.C. 1996. Metatopolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiol. Plant.*
69. Wu, W., Du, K., Kang, X., Wei, H. 2021. The diverse roles of cytokinins in regulating leaf development. *Hortic. Res.* 8.
70. Yildiz, M. 2012. The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration, *Recent Advances in Plant in vitro Culture.*
71. Yin, J., Zhang, Z.W., Yu, W.J., Liao, J.Y., Luo, X.G., Shen, Y.J. 2010. Stachydrine, a major constituent of the chinese herb *leonurus heterophyllus* sweet, ameliorates human umbilical vein endothelial cells injury induced by anoxia-reoxygenation. *Am. J. Chin. Med.* 38, 157–171.

7. Životopis

Davor Jembrek rođen je 10. studenog 1997. godine u Koprivnici. Osnovnu školu završio je u Kalniku, nakon čega je od 2012. do 2016. godine pohađao Srednju gospodarsku školu u Križevcima, smjer Poljoprivredni tehničar – opći. U četvrtom razredu srednje škole sudjelovao na državnom natjecanju učenika i učenica srednjih škola Republike Hrvatske u obrazovnom sektoru poljoprivrede, prehrana i veterina, disciplina Agro. Natjecanje se je održalo u Zadru gdje je osvojio drugo mjesto i time ostvario izravan upis na Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet gdje i započinje svoje akademsko obrazovanje na studiju Biljne znanosti. Na trećoj godini fakulteta dobiva Rektorovu nagradu za rad pod naslovom „Utjecaj ozona na suzbijanje kukaca“ koja mu donosi nekoliko znanstvenih radova i kongresnih priopćenja. Studij završava 2019. godine te stječe titulu sveučilišnog prvostupnika agronomije (univ.bacc.ing.agr). Svoje obrazovanje nastavlja na diplomskom studiju Biljne znanosti, koji upisuje 2019. godine. S početkom studija, izabran je u Studentski zbor, te uz to bude izabran za studentskog pravobranitelja. Stručnu praksu odrađuje na zavodu za Oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku. 2021. godine odlazi na Erasmus+ stručnu praksu na Mendel Sveučilište u Brnu u periodu od 01.06.-01.08.2021. Najesen 2021. godine upisuje apsolventsku godinu, te ponovo odlazi na Erasmus+ stručnu praksu na Mendel Sveučilište u Brnu u periodu od 09.05.-15.08. Prilikom oba boravka na stručnoj praksi radio je na Zavodu za biljnu biologiju gdje je stekao nova znanja i iskustva.