

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Mikropropagacija merale
(*Amelanchier alnifolia* Nutt.)**

DIPLOMSKI RAD

Antonio Pavičić

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Biljne znanosti

**Mikropropagacija merale
(*Amelanchier alnifolia* Nutt.)**

DIPLOMSKI RAD

Antonio Pavičić

Mentor: prof. dr. sc. Snježana Kereša

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Antonio Pavičić**, JMBAG 0178093384, rođen 27.08.1993. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

Mikropropagacija merale (*Amelanchier alnifolia* Nutt.)

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

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Antonio Pavičić**, JMBAG 0178093384, naslova

Mikropropagacija merale (*Amelanchier alnifolia* Nutt.)

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|--|--------|-------|
| 1. | prof. dr. sc. Snježana Kereša | mentor | _____ |
| 2. | doc. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović | član | _____ |
| 3. | doc. dr. sc. Kristina Batelja Lodeta | član | _____ |

Zahvala

Ovime zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Snježani Kereša na ukazanom povjerenju, na svakom trenutku izdvojenog vremena dok me je stručnim savjetima i vodila kroz ovaj rad te na motivaciji u svrhu mog napredovanja.

Također, zahvaljujem se docentici dr. sc Aniti Bošnjak Mihovilović za savjete tijekom laboratorijskih pokusa.

Od sveg srca zahvaljujem se svojim roditeljima, Gabrijeli i Vjekoslavu te sestri Franciski koji su bili velika potpora kroz cijelo razdoblje školovanja. Hvala Vam!

Za kraj zahvala svim djelatnicima Agronomskoga fakulteta u Zagrebu.

*„Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.
The important thing is not to stop questioning“*

Albert Einstein

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Antonio Pavičić**, naslova

Mikropropagacija merale (*Amelanchier alnifolia* Nutt.)

Merala (*Amelanchier alnifolia* Nutt), bobičasta je voćna kultura s područja Sjeverne Amerike. Izgledom ploda podsjeća na američku borovnicu, ali prema nutritivnim vrijednostima bolja je od nje. Radi se o voćnoj vrsti koja je adaptabilna našem uzgojnom području i ima veliki gospodarski potencijal. Merala se razmnožava vegetativno, a u novije vrijeme koristi se mikropropagacijska tehnika. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati učinke agara, citokinina, PPM-a i giberelinske kiseline na uspješnost mikropropagacije merale.

Za uspostavu kulture korišteni su vegetacijski vršci veličine 1-1.5 mm izolirani iz aksilarnih pupova. Dobiveni izdanci korišteni su u daljnjim pokusima.

Agar (Plant agar) kao komponenta hranidbenog medija imao je značajan efekt na mikropropagaciju merale. Kako bi se utvrdila optimalna koncentracija hormona rasta korišteni su 6-benzilaminopurin (BAP) i meta-topolin (mT) u koncentraciji od 0.3 i 1 mg/L te medij bez hormona (HFM). Prosječno najveći broj izdanaka (3.1), uzimajući u obzir obadrije koncentracije hormona, postignut je na mediju s mT. U dužini izdanaka nije bilo signifikantne razlike obzirom na vrstu citokinina, ali su signifikantno duži izdanci dobiveni na nižim koncentracijama (0.3 mg/L) citokinina. Kao najbolji tretman (citokinin x koncentracija) za broj izdanaka pokazao se je MS s 1 mg/L mT na kojem je dobiveno 4.7 izdanaka po eksplantatu. Giberelinska kiselina nije značajni faktor za povećanje broja izdanaka, ali nešto bolji rezultati postignuti su na koncentraciji 0.2 mg/L GA₃. Antibiotičko sredstvo PPM nije pokazalo značajan utjecaj na mikropropagaciju merale.

Uz razmnožavanje, najveći problem mikropropagacije merale je zakorjenjivanje *in vitro* izdanka. Postotak zakorjenjivanja izdanaka bio je 28% na MS s 2 mg/L NAA.

Ključne riječi: merala, *Amelanchier alnifolia* Nutt, mikropropagacija, biljni regulatori rasta, PPM, giberelinska kiselina

Summary

Of the master's thesis - student **Antonio Pavičić**, entitled

Micropropagation of Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.)

The Saskatoon berries are fruit species from North America. The shape is similar to a blueberry, but the nutrition value is better than blueberry. Saskatoon berries are adaptable to our production area and have huge economic potential. Most common method for propagation of Saskatoon berry is vegetative propagation but micropropagation is used as well. The aim of this work was to investigate the effects of agar, cytokinin, PPM, and gibberellic acid on the success of micropropagation of Saskatoon berries.

We have been using shoot tips (1-1,5 mm) isolated from axillary buds for culture establishment. Micropropagated shoots of Saskatoon berries were used in further experiments.

Agar (Plant agar) as a component of MS medium had a significant effect on the micropropagation of Saskatoon berry. To determine the optimal concentration of growth regulators we used 6- benzylaminopurine (BAP) and Metatopolin (mT) in the concentration of 0.3 and 1 mg/L and medium without hormones (HFM). Average of highest number of shoots (3.1), considering both concentrations of hormones, was at MS with mT. There was not a significant difference in the length of the shoots considering a type of cytokines.

In the length of the shoots, there was not significant, but significant longer shoots were on lower concentration (0.3 mg/L) of cytokinins. As the best treatment (cytokinin x concentration) for a number of shoots was MS with 1 mg/L of mT and they produced 4.7 shoots per explant. Gibberellic acid was not a significant factor for the number of shoots, but better results were at 0.2 mg/L of GA₃. Also, biocide (PPM) was not significant in this research.

Along with shoot proliferation, the greatest problem of micropropagation is *in vitro* shoot rooting of Saskatoon berry. Percentage of rooting was 28% on MS with 2 mg/L NAA.

Keywords: Saskatoon berry, *Amelanchier alnifolia* Nutt, micropropagation, plant growth regulator, PPM, gibberellic acid

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Pregled literature	2
2.1. Morfologija, taksonomska pripadnost i agronomska obilježja	2
2.2. Problematika razmnožavanja merale	9
2.3. Mikropropagacija i biljni hormoni	9
2.4. Cilj	12
3. Materijali i metode.....	13
3.1. Biljni materijal	13
3.2. Sterilizacija biljnog materijala i postavljanje u <i>in vitro</i> kulturu.....	13
3.3. Pokusi mikropropagacije	13
3.4. Plan pokusa i statistička analiza podataka	15
4. Rezultati i rasprava.....	16
4.1. Utjecaj vrste agara na uspješnost mikropropagacije	16
4.2. Utjecaj vrste i koncentracije citokinina na uspješnost mikropropagacije	17
4.3. Utjecaj različitih koncentracija giberelinske kiseline na mikropropagaciju ...	21
4.4. Utjecaj PPM-a na mikropropagaciju	22
4.5. Zakorjenjivanje	23
5. Zaključak.....	25
6. Popis literature	26
7. Prilog	29
Životopis.....	30

1. Uvod

Amelanchier alnifolia Nutt. latinski je naziv za biljnu vrstu koju mi nazivamo merala. Radi se o biljnoj vrsti koja je rasprostranjena u hladnijim područjima pa se tako može naći u Kanadi ili sjevernom dijelu SAD-a. To ujedno govori i o njenoj otpornosti na hladnije uvjete.

Merala je bobičasti grm koji nalikuje na borovnicu kao i njen plod, ali radi se o posve dvije različite vrste, štoviše prema istraživanjima, bobice merale imaju bolja svojstva od borovnice. Iako je riječ o relativno nepoznatoj kulturi u našim područjima moglo bi se pretpostaviti da njeno otkrivanje i pojačan uzgoj tek dolaze. Iskorištavanje same biljke jednako je kao i kod ostalih bobičastih voćaka.

Uzgoj u našim krajevima ne bi trebao predstavljati problem uz adekvatnu pripremu, ali glavni problem na Svjetskoj razini je razmnožavanje merale. Radi se voćnoj vrsti koja se teško razmnožava, ali svakako da postoji prostor za napredak i komercijalizaciju.

Merala se razmnožava vegetativnim putem, a u zadnje vrijeme i mikropropagacijom. Modernom tehnikom, kulturom tkiva, stvaraju se biljke koje su identične majčinskoj uz jednostavniji i brži način. Osim adekvatnog laboratorija i znanja stočnog osoblja potrebno je riješiti problem razmnožavanja i zakorjenjivanja merale u komercijalne svrhe.

Tijekom rada uvjerali smo se da merala dobro mikropropagira no prostora za poboljšanje uspješnosti sigurno ima još. Također je potrebno razviti protokol za uspješno zakorjenjivanje. Ovaj rezultat može se postići poznavanjem tehnike mikropropagacije, potrebama biljke za hranjivima te korištenjem biljnih hormona u adekvatnoj podlozi. U ovom radu bit će prezentirana biljna vrsta, problematika njezinog razmnožavanja te uspješnost mikropropagiranja izdanaka.

2. Pregled literature

2.1. Morfologija, taksonomska pripadnost i agronomska obilježja

Amelanchier alnifolia Nutt. je višegodišnja grmolika biljna vrsta koja pripada rodu *Amelanchier* i porodici ruža – *Rosaceae* (Tablica 1). Iako bobičasta srodnija je jabukama. Pruski i sur. (1991) u svome radu navode da je kromosomski broj *Amelanchier alnifolia* $2n=34$, osnovni kromosomski broj $n=17$, a osim diploida ($2n$) postoje još i tetraploidi $4n=68$.

Tablica 1. Taksonomska podjela *Amelanchier alnifolia* Nutt

Carstvo	Plantae
Odjeljak	Magnoliophyta
Koljeno	Magnoliopsida
Red	Rosales
Porodica	Rosaceae
Rod	<i>Amelanchier</i>
vrsta	<i>Amelanchier alnifolia</i>

Radi se o grmolikoj voćnoj kulturi koju u stranoj literaturi susrećemo pod nazivima Saskatoon (Saskatoon berry) ili Juneberry. Ovi nazivi koriste se na kanadskom i američkom području, štoviše Saskatoon ili Juneberry rasprostranjeni su prerijskim prostranstvima tih dviju država (Slika 1). Prvi koji su uživali u plodovima ove biljke bili su starosjedioci Sjeverne Amerike te naziv koji su koristili bio je: “*misâskwatômina*”. Europski doseljenici, skratili su ovaj indijanski naziv na danas poznati „saskatoon“. Merala je također proširena i u Europi; neki od sinonima prikazani su na Slici 2.



Slika 1. Areal rasprostranjenosti na području Sjeverne Amerike.
Izvor: Wikipedija

Czech: Muchovník Olšolistý;
Danish: Ellebladet Bærmispel;
Eastonian: Lepalehine Toompihlakas;
Finnish: Marjatuomipihlaja;
French: Amélanhier À Feuilles D’aulne;
German: Erlenblättrige Felsenbirne;
Icelandic: Hlíðaramall;
Norwegian: Taggblåhegg;
Swedish: Bärhäggmispel, Grovsågad Häggmispel, Sen Häggmispel, Västamerikansk Häggmispel.

Slika 2. Sinonimi za *Amelanchier alnifolia* u Europi.
Izvor: <https://www.springer.com/us/book/9789400740525>

Merala ima tipičan rast za grmolike kulture s razvijenih nekoliko uspravnih drvenastih grana koje mogu rasti iz podnožja same biljke ili iz pupova koji se nalaze povišeno na bazi stabljike (Remphrey i Pearn, 2006). Također može narasti od 1 do 5 m visine te 3 do 6 metara u širinu ako se ostavi dosta prostora u redu (Slika 3).

Listovi su dužine od 2.5 do 5.5 cm i širine 2 do 4.5 cm, glatkog ili nazubljenog ruba i kolutićavog oblika.

Krunica latice je bijele boje (Slika 4) te duljine 8 do 15 mm, lapovi i latice bazirani su na broju 5. Merala ima (10) 20 prašnika, a samo jedan tučak. Cvjeta od travnja do svibnja, a plod sazrijeva od srpnja do kolovoza.



Slika 3. Grmolik izgled *Amelanchier alnifolia*
Izvor: Spencer i sur. (2013) „Saskatoon Berry
Production Manual“



Slika 4. Cvijet *Amelanchier alnifolia*
Izvor: Spencer i sur. (2013) „Saskatoon Berry
Production Manual“

Plod je bobica ovalno-okruglog oblika, tamno plave boje nalik borovnici (Slika 5 a i b). Veličina nije ujednačena. Zreli plod je jako sladak, ali ima opor okus, vrlo bogat vitaminima i drugim korisnim tvarima.



Slika 5 a. Plod u zelenom stanju.

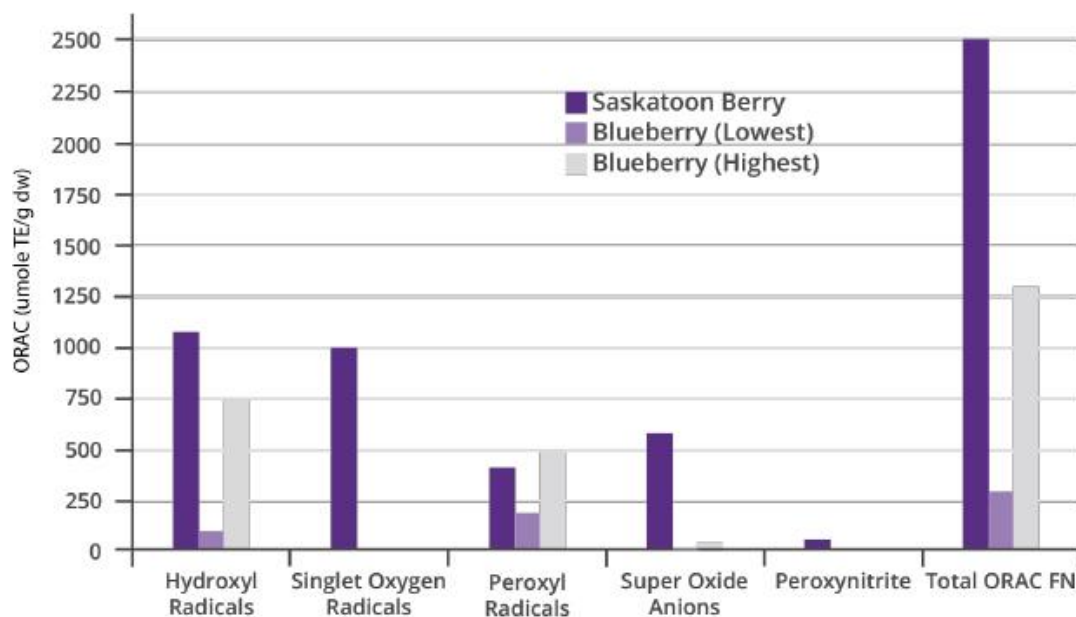


Slika 5b. Plod u punoj zrelosti.

Izvor: Spencer i sur. (2013) „Saskatoon Berry Production Manual“

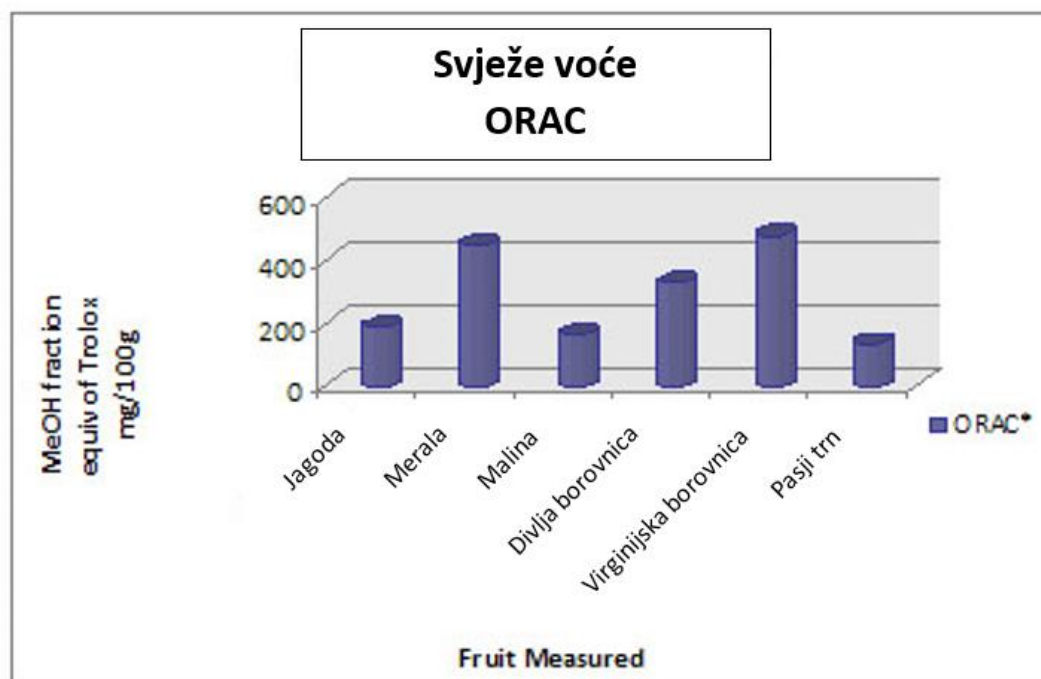
Plod nalikuje plodu borovnice, ali ima deblju kožu i gušći sok. Svježi plod sadrži relativno velike količine kalija, željeza i magnezija. Također odličan je izvor mangana, kalcija, kalija, bakra i karotena (Tablica 2).

Osim makronutrijenata, bobice su bogate fenolnom kiselinom. Uz sve navedeno bogate su antocijanskim i flavonoidnim spojevima kao što su: rutin, hiperozid, avicilin i kvercetin (Juríková 2013). Nedavna istraživanja pokazuju da Saskatoon bobice imaju višu razinu antioksidansa u usporedbi s borovnicama (Slika 6) a i drugim bobičastim vrstama (Slika 7). Osim toga nutritivna svojstva su viša u odnosu na ostalo bobičasto – jagodičasto voće (Slika 8).



Slika 6. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) metoda mjerenja antioksidansa između merale i borovnice.

Izvor: <https://prairieberries.com/wp-content/uploads/2017/01/anti-graph.jpg>



Slika 7. Usporedni rezultati mjerenja ORAC metodom u odnosu na ostalo voće.

Izvor: <http://saskatoonberryinstitute.org/saskatoons/>

Tablica 2. Nutritivna svojstva *Amelanchier alnifolia*

Nutrients in raw saskatoon berries		
Nutrient	Value per 100 grams	% Daily Value
Energy	85 kcal	
Total dietary fiber	5.9 g	20%
Sugars, total	11.4 g	8%
Calcium, Ca	42 mg	4%
Magnesium, Mg	24 mg	6%
Iron, Fe	1 mg	12%
Manganese, Mn	1.4 mg	70%
Potassium, K	162 mg	3%
Sodium, Na	0.5 mg	0%
Vitamin C	3.6 mg	4%
Vitamin A, IU	11 IU	1%
Vitamin E	1.1 mg	7%
Folate, mcg	4.6 mcg	1%
Riboflavin	3.5 mg	>100%
Panthenic acid	0.3 mg	6%
Pyridoxine	0.03 mg	2%
Biotin	20 mcg	67%

Izvor: <http://www.saskatoonmichigan.com/2010/12/saskatoon-berries-as-a-superfruit/>

<i>U 100 g</i>	Merala	Borovnica	Jagoda	Malina
<i>Energetska vrijednost</i>	84.84 kcal	51 kcal	37 kcal	49 kcal
<i>Bjelančevine</i>	1.33 g	0.42 g	0.7 g	0.91 g
<i>Ugljikohidrati</i>	18.49 g	12.17 g	8.4 g	11.57 g
<i>Masti</i>	0.49 g	0.64 g	0.5 g	0.55 g
<i>Vlakna</i>	5.93 g	2.7 g	1.3 g	4.9 g
<i>Vitamin C</i>	3.55 mg	2.5 mg	59 mg	25 mg
<i>Željezo</i>	0.96 mg	0.18 mg	1 mg	0.75 mg
<i>Kalij</i>	162.12 mg	54 mg	21 mg	152 mg
<i>Vitamin A</i>	35.68 IU	100 IU	27 IU	130 IU

Slika 8. Nutritivna svojstva *Amelanchier alnifolia* u odnosu na borovnicu, jagodu i malinu.

Izvor: <http://saskatoonberryinstitute.org/saskatoons/>

Merala je izdržljiva i tolerantna voćna vrsta. Otporna je na niske temperature i sušu te je tolerantna na širok raspon pH tla (St-Pierre, 2005). Također preferira ocjedita ilovasta do pješčana tla s velikom količinom organske tvari u tlu. Iako podnosi sušu, za ozbiljnu proizvodnju potreba je zadovoljavajuća razina vode. Preferira sunčane položaje (Lawyer Nursery inc 2012).

Autori Spencer i sur. (2013) opisuju u svome radu uzgojne uvjete za Kanadsko područje. Navedene smjernice uzgojnog oblika mogle bi se primijeniti i u našem području. Iako postoje sezonske temperaturne razlike, merala bi se mogla uzgajati na našem području. Nadalje odabir pogodnog mjesta za podizanje voćnjaka koji bi trajao 25 do 35 godina trebao bi biti pretežni cilj proizvodnje. Kod odabira mjesta za voćnjak treba uzeti u obzir sljedeće čimbenike: topografiju, vrstu tla, zaštitne pojaseve, dostupnost kvalitetne vode.

Topografija

Idealno mjesto za podizanje voćnjaka je sjeveroistočna ili istočna strana s umjerenim nagibom (1-5%) terena. Ovom lokacijom omogućio bi se dobar protok zraka kao i odvod viška vode prema dnu padine. Nagib terena od 1 do 5% pruža zaštitu od sunčanih i zimskih oštećenja, oštećenja mrazom te stresova izazvanih sušom. Trebalo bi izbjegavati jugoistočne i zapadne obronke zbog eventualnog nedostatka snijega zimi. Osim toga na takov terenu prevladavaju zapadni i sjeverozapadni vjetrovi. Jugozapadni i zapadni obronci uzrokuju rano cvjetanje koje je rizično zbog potencijalnih ranih mrazeva. Sjeverna strana, a i sadnju na dnu padine ne bi trebalo uzimati u obzir pri podizanju nasada. Sjeverna strana ne pruža dovoljno sunca, a pri sadnji na dnu padine moguća su oštećenja od mraza ili stajaćih voda (Spencer i sur. 2013).

Osim položaja samog voćnjaka, položaj redova u voćnjaku ima važnu ulogu. Orijehtacija redova utječe na cirkulaciju zraka i količini svjetlosti. Redovi u smjeru sjeveroistočne-južne orijentacije dobivaju maksimalnu količinu svjetlosti dok redovi zasađeni u smjeru istok-zapad primaju maksimalni protok zraka sukladno prevladavajućim vjetrovima. Uz pretpostavku da se radi o nagnutom terenu trebalo bi dopustiti da hladni zrak izlazi iz voćnjaka, a smanjiti utjecaje erozije i olakšati mehaničku berbu. Na ovakvoj lokaciji preporuča se dijagonalni položaj redova (Spencer i sur. 2013).

Tlo

Autori St-Pierre (2005) i Spencer i sur. (2013) spominju da je merala zahvalna prema uvjetima tla, ali ako se radi o perspektivnoj proizvodnji treba uzeti u obzir sljedeće činjenice. Raspon pH tla trebao bi biti od 6 do 7.5 (maksimalno 8). Izbjegavati sadnju na slanome ili močvarnom tlu jer korijenski sustav je osjetljiv na slabo drenirano ili prevlažno tlo. Karakteristike dobrog tla: dobro isušeno, pješčane do vapnenaste strukture, bez višegodišnjih korova, pH 6,0-7,5 i razina organske tvari 2-3 %.

Voda

Bez adekvatne količine vode u nasadu nema ni biljaka odnosno ploda. Potrebe merale za vodom razlikuju se od lokaliteta, starosti biljke te količini vode koja je akumulirana kroz zimsko-proljetni period. U slučaju navodnjavanja voćnjaka, provodi se primjena kap po kap sustava. Prednost tog sustava je primjena vode najbliža zoni korijena, smanjena je evaporacija vode za navodnjavanje, sprječava se širenje korova u redu, smanjuje se pojava bolesti na lišću te postoji mogućnost prihranjivanja (Spencer i sur. 2013).

Hranjivih tvari u samom podizanju nasada trebalo bi biti 70 kg N/ha, 100 kg P/ha, 400 kg K/ha, dok bi se prihrana mogla provesti sa 33-55 kg N/ha, 22-44 kg P/ha tijekom početka svibnja i kraja lipnja (Spencer i sur. 2013)

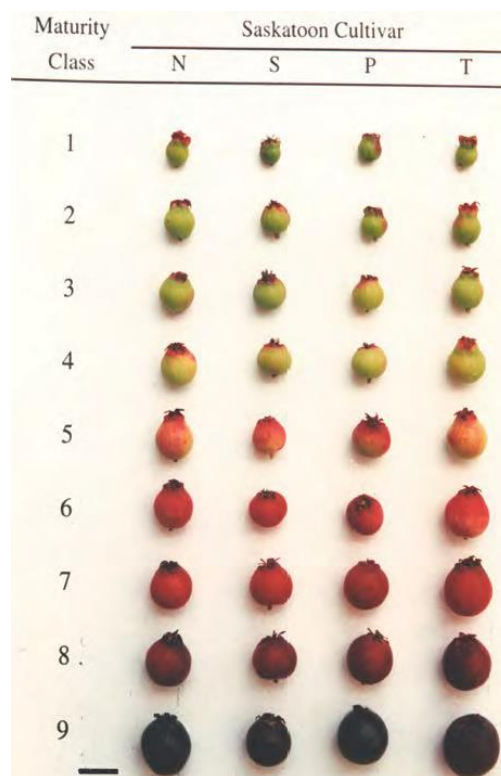
Gospodarska korist

Prema autoru Juríková (2013) u Kanadi je naglašena gospodarska uloga merale kao komercijalno prihvatljive kulture. U SAD-u se koristi u obliku svježeg voća ili u prerađevinama kao što su: džemovi, pite i želei.

Prema St-Pierre (2005) sorte merale odabrane su na temelju superiorne veličine ploda, okusa, prinosa, vremena cvjetanja i boje cvjetova, ploda i otpadanju lišća. Razlike kao što su veličina i težina ploda, kiselost, sadržaj šećera i prinos mogu znatno varirati (Slika 9).

Poznato je 26 kultivara merale. Najčešće korištene sorte u uzgoju na kanadskom-američkom području su: Honeywood, Martin, Northline, Pembina, Smoky i Thiessen.

Na prostorima kanadskih prerija zasađeno je više od 1200 ha, a samo u provinciji Alberta ima 600 ha pod ovim nasadom. Proizvodnja bobica se procjenjuje na 1.35 milijuna kilograma.



Slika 9. Razlika u sortama.

Izvor: Spencer i sur. 2013 „Saskatoon Berry Production Manual“

2.2. Problematika razmnožavanja merale

Vodeći se vlastitim znanjem i stečenim iskustvom radi se o kulturi koja iako ima dobru perspektivu nailazi na problem razmnožavanja.

Postoji nekoliko modela ili načina razmnožavanja kao što su

- a) generativni,
- b) vegetativni i
- c) novija metoda mikrorazmnožavanja.

a) Generativni način nije prihvatljiv u segmentu proizvodnje ujednačenih sadnica zbog stranooplodnje i rekombinacije gena. Vršiti se sjetvom sjemena (St-Pierre 2005), ali su sadnice dobivene iz sjemena genotipski i fenotipski neujednačene. Usprkos tome na hrvatskom tržištu moguće je kupiti sjemenke merale (internetska prodaja).

b) Za vegetativno razmnožavanje pomoću reznica koriste se izboji. Vegetativno razmnožavanje je aseksualno razmnožavanje te dijelovi za vegetativno razmnožavanje dolaze od biljnih dijelova kao što su izboji ili korijen (St-Pierre 2005). Vegetativnim razmnožavanjem nema rekombinacije gena što upućuje na to da se zadržavaju svojstva majčinske biljke (majčinska biljka je ona biljka od koje je uzet biljni materijal). Prema autoru St-Pierre (2005), navodi se da biljke razmnožene vegetativnim putem prije ulaze u rod od onih uzgojenih generativnim putem.

c) Mikrorazmnožavanje je, trenutno, najbolja metoda za masovnu propagaciju merale. Ovom metodom ostvaruje se brza produkcija genetički ujednačenih biljaka koje imaju ujednačen i dobar rast. Problem samog mikropropagiranja je u kompleksnoj tehnici koja je ujedno i najskuplja od ove tri navedene. Navedena tehnika primjenjuje se od 1987 godine (St-Pierre 2005). Također isti autor navodi da mikropropagacijom biljke ne postaju superiornije ili inferiornije u odnosu na biljke dobivene drugim načinima uzgoja, ali mikropropagacija omogućava masovnu proizvodnju biljnog materijala

2.3. Mikropropagacija i biljni hormoni

Metoda *in vitro* razmnožavanja pogodna je u razmnožavanju različitih biljnih vrsta. Osim spomenutog naziva koristi se i klonaska propagacija – tom metodom se stvaraju klonovi. Osim kod vrste istražene u ovom radu, tehnika mikropropagacije primjenjuje se i kod ostalih biljnih vrsta kojima je otežana generativna ili vegetativna mogućnost stvaranja većega broja biljaka za podizanje nasada ili komercijalnu proizvodnju. U znanstvenom krugu često se susreću radovi u kojima je opisana mikropropagacija voćaka kao što su: jagode, borovnice, maline, kupine, banane itd. Osim toga tehnike mikropropagacije primjenjuju se i u području voćarstva i vinogradarstva pri proizvodnji podloga ili očuvanja biljnih izvora u *in vitro* uvjetima.

Mikropropagacija se koristi i u povrćarstvu, zatim u proizvodnji ljekovitog i aromatičnog bilja te za očuvanje raznih rijetkih i ugroženih vrsta i vrijedne germplazme poljoprivrednog bilja u *in vitro* bankama gena (Rajasekharan, 2015).

Mikrorazmnožavanjem čuvamo biljni genetski fond za buduća vremena ili za mogućnost internacionalne razmjene biljnog fonda uz sigurnost da se radi o sterilnom materijalu.

Prilikom mikropropagacije najčešće se koriste vršni meristem te njegovom mikropropagacijom na hranjivoj podlozi dolazi do razvijanja novih biljaka. Ako se mikropropagacija započne s izoliranim meristemima možemo mikropropagacijom dobiti i tzv. „virus free“ biljni materijal.

Pri mikropropagaciji koja se odvija u laboratoriju na samu uspješnost iste utjecat će vanjski i unutarnji uvjeti. Pod vanjskim uvjetima podrazumijeva se: temperatura i svjetlost. Navedeni uvjeti moraju biti u optimalnim vrijednostima za optimalan rast i razvoj biljaka. Pod internim uvjetima podrazumijevamo: hranidbenu podlogu te biljne hormone.

Hranjiva podloga ili hranidbeni medij je sterilni medij u kojeg ili na kojeg se polaže izolirani biljni materijal u svrhu mikropropagacije. Sama hranjiva podloga je prilagodljiva kulturi uzgoja te ih ima različitih vrsta: Murashige i Skoog, White, Gamborg B5, Heller, Knudson, itd. Neovisno o vrsti medija, svaki se sastoji od četiri glavne komponente:

- makro i mikro elemenata u obliku mineralnih soli (različiti hranidbeni mediji sadrže ih u različitim koncentracijama),
- ugljikohidrata – izvor energije,
- organskih dodataka – vitamini, aminokiseline itd, te
- regulatora rasta (biljni hormoni).

Hranjiva podloga bila bi tekućeg oblika da u nju ne dodajemo agar. Agar je danas najčešće upotrebljavano sredstvo za ukrućivanje podloga. Proizvod se kupuje u obliku suhog praška koji se dobiva ekstrakcijom i sušenjem sluznate tvari dobivene od morske trave *Gelidium*. Danas se zna da agar nije fiziološki inertan materijal; on je izvor različitih stimulativnih i koćećih supstancija u smislu rasta biljnih stanica (Jelaska, 1994).

Osim spomenutog agara u bazičnu hranjivu podlogu se dodaju i hormoni rasta tj. biljni hormoni.

Ako u podlozi ima svih ostalih potrebnih elemenata u optimalnoj količini, reakcija izrezana tkiva najviše će ovisiti o auksinima i citokininima. Reakcija eksplantata bit će rezultat djelovanja postojeće razine endogenih i egzogeno dodanih hormona u podlozi (Jelaska, 1994). U mikropropagaciji najčešće se koriste auksini i citokinini te giberelini. Biljke imaju sposobnost pohraniti višak egzogeno isporučenih hormona u obliku reverzibilnih zaliha koje bi oslobađale pod utjecajem aktivnih hormona gdje i kada bi ih biljka trebala za vrijeme rasta (Tiwari, 2011).

Najčešće korišteni auksini u kulturi tkiva su: indolil-3-octena kiselina (IAA), indolil-3-maslačna kiselina (IBA), 2,4-diklorofenoksiocetna kiselina (2,4-D) i 1-naftalen-octena (NAA). IAA je jedini prirodni auksin kojeg susrećemo dok postoje i ostali sintetičkog podrijetla. Biljni

hormoni iz skupine auksina koriste se za stimuliranje proizvodnje kalusa i staničnog rasta, za pokretanje izbojaka i korijena, za poticanje somatske embriogeneze, za poticanje rasta iz vrhova izbojaka (Abobkar i sur, 2012).

U mikropropagaciji auksini se primjenjuju kao hormoni za zakorjenjivanje, a male koncentracije auksina ponekad su, uz citokinine, potrebne i za proliferaciju izdanaka. Citokinini su najvažniji za proliferaciju novih izdanaka iz postojećih meristema metodom aksilarnog grananja, ali i za formiranje novih adventivnih izdanaka iz različitih eksplantata (Saad i Elshahed, 2012).

Skupinu citokinina čine: BAP (6-benzilaminopurin), 2iP (2-izopentiladenin), KIN (kinetin) i TDZ (tidiazuron). Prirodno dostupni citokinini su zeatin i 2iP, ali zeatin je učinkovitiji. Njihova uloga u kulturi tkiva je poticanje diobe stanica, induciranje formiranja izboja te usporavaju stvaranje korijena (Abobkar i sur, 2012). Razlog zbog kojih su BAP i KIN najkorišteniji citokinini u biotehnologiji je taj što su izrazito biološki aktivni i cjenovno pristupačni (Podlešakova i sur. 2012.) .

Citokinini su relativno stabilni spojevi te se mogu pohraniti na -20°C .

Za citokinine se često tvrdi da se teško otapaju, ali mogu se otopiti u nekoliko kapi 1N HCl ili 1N NaOH te u malim količinama dimetilsulfoksida (DMSO). DMSO ima dodatnu prednost jer djeluje kao sredstvo za sterilizaciju; tako se zaliha otopina koja sadrži DMSO može izravno dodati u sterilni medij kulture (Abobkar i sur, 2012).

Posljednjih godina vrlo zanimljiv za mikropropagaciju postaje i meta-topolin (mT) (Werbrouck i sur., 1996). Tijekom mikropropagacije citokinini se akumuliraju u izdancima, a visoke koncentracije citokinina mogu inhibirati zakorjenjivanje. Za razliku od BAP-a, mT se puno brže metabolizira što je razlog da izdanci mikropropagirani na ovom hormonu bolje zakorjenjuju i u većem postotku preživljavaju aklimatizaciju (Bairu i sur. 2007).

Giberelini sudjeluju u regulaciji mnogih procesa rasta i razvoja kod raznih biljaka a posebno su važni u izduživanju stabljike (Tiwari, 2011). Giberelini sadrže više od dvadeset spojeva, od kojih je GA_3 najčešće korišten giberelin. Ti spojevi poboljšavaju rast kalusa i pomažu u produljenju patuljastih biljaka (Abobkar i sur. 2012). Giberelinska kiselina (GA_3) je odgovorna za poticanje proizvodnje mRNA molekule u stanicama a takva produkcija dovodi do kodiranja hidrolitičkih enzima koji dovode do ubrzanog rasta (Tiwari, 2011).

Uz sve spomenuto u podlogu se dodaju i vitamini te ponekad antibiotici.

Od različitih vitamina koji se dodaju hranidbenim podlogama i koji se upotrebljavaju u posebnim slučajevima, čini se da je samo B1 ili tiamin (u obliku hidroklorida) doista prijeko potreban za kulturu biljnih stanica, jer ga one ne mogu sintetizirati u potrebnoj količini. Nikotinska kiselina i B6 također mogu povoljno djelovati na rast (Jelaska, 1994).

Iako se biljni materijal prije same kultivacije podvrgnuo sterilizaciji moguća je kontaminacija eksplantata u samoj mikrokulturi. Teoretski, postoje dva načina da se oslobodimo interne infekcije:

1. kultura vršnog meristema jer su mikroorganizmi u meristemu malokad prisutni i
2. dodavanje antibiotika u hranidbenu podlogu (Jelaska, 1994).

Kontaminacija bakterijama, gljivicama i kvascima su stalni izazovi koji se mogu susresti u kulturi tkiva te su studije proučavale eliminaciju samih kontaminacija fungicidnim i antibiotskim tretmanima (Rihan i sur. 2012).

Također Rihan i sur. (2012) u svojem radu navode da utjecaj ovakvih preparata može dovesti do rezistentnosti mikroorganizma na aktivnu tvar ili interakciju uvjetovanom toplinom autoklaviranja.

Jedan od biocida je i PPM™ (Plant Preservative Mixture) kompanije Plant cell echnology. Termalno stabilan biocid koji učinkovito sprječava ili smanjuje mikrobnu kontaminaciju u kulturi biljnog tkiva. PPM ne utječe na klijavost sjemena, polifraciju izboja ili regeneraciju kalusa nego sprječava klijanje bakterija i spora. Aktivni sastojci u PPM-u uključuju metilizotiazolinon, magnezijev klorid, magnezijev nitrat, natrijev benzoat i kalijev sorbat.

Compton i Koch (2001) u svome radu navode da, zajedno, ove anorganske soli djeluju tako da ciljaju osnovne specifične enzime u Krebsovom ciklusu i lancu prijenosa elektrona. Pokazalo se da PPM inhibira rast mikroorganizama. Osim toga prednosti PPM u odnosu na antibiotike je učinkovitost protiv gljivica, jeftiniji je, termostabilan a to mu omogućuje autoklaviranje i ne stvara se rezistentnost kod biljaka.

2.4. Cilj

Uvodni opis povezanosti problematike razmnožavanja merale i moderne tehnologije mikropropagacije tkiva upućuje na to da postoji zainteresiranost i mogućnost utjecaja pojedinih čimbenika u kulturi tkiva na uspješnost mikropropagacije u znanstveno i komercijalne svrhe.

Stoga su ciljevi ovog rada istražiti:

1. utjecaj različitih vrsta agara na mikropropagaciju merale
2. uspješnost mikropropagacije u ovisnosti o vrsti i koncentraciji citokinina
3. utjecaj PPM-a na uspješnost mikropropagacije
4. utjecaj različitih koncentracija giberelinske kiseline (GA_3) na mikropropagaciju
5. utjecaj različitih auksina na zakorjenjivanje merale

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

Jednogodišnji izboji (grane) merale (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) sakupljeni su početkom veljače na OPG-u pokraj Križevaca. Grane su držane u vodi na sobnoj temperaturi 10-ak dana nakon čega je izvršena sterilizacija biljnog materijala i izolirani vegetacijski vršci iz aksilarnih pupova.

Za drugo postavljanje korišteni su nodalni segmenti cvjetnih grančica koje su porasle nakon 20-ak dana držanja grana u vodi na sobnoj temperaturi.

Dodatnom postavljanju iz nodalnih segmenta pristupilo se je zbog:

1. vidljive kontaminacije vegetacijskih vršaka izoliranih iz aksilarnih pupova
2. jer su velik udio izoliranih vegetacijskih vršaka zapravo činili cvjetni pupovi.

3.2. Sterilizacija biljnog materijala i postavljanje u *in vitro* kulturu

Mladi izdanci ispirani su pod tekućom vodom oko pola sata. Nakon ispiranja biljni materijal je prenesen u laminar i prebačen u sterilne čaše. Površinska dekontaminacija biljnog materijala provedena je najprije sa 70% etanolom 2 minute, a potom u 3% otopini Izosana G s dodatkom ovlaživača Tween-a 20 u trajanju 15 minuta. Biljni materijal je potom ispiran 3 puta u destiliranoj sterilnoj vodi kojoj je bila dodana askorbinska kiselina u koncentraciji 150 mg/L.

Vegetacijski vršci veličine 1.5 mm izolirani su iz pupova pod stereomikroskopom pomoću precizne pincete i skalpela i pojedinačno postavljeni u staklene epruvete na uspostavni medij (EM-establishment medium) (Tablica 3), zatvorene vatom i Al folijom. Nakon uočene kontaminacije vegetacijskih vršaka, za nodalne segmente je nakon sterilizacije u autoklavu u EM dodan i antibiotik Altacef 500 mg/L.

3.3. Pokusi mikropropagacije

Kada je proizveden dovoljan broj izdanaka, postavljeni su pokusi radi utvrđivanja postavljenih ciljeva (utjecaj regulatora rasta, agara i PPM-a na proliferaciju.)

U tim supkultivacijama korišten je medij za proliferaciju (PM) (Tablica 3). U mediju za proliferaciju varirani su citokinini, međutim, u jednom potpokusu umjesto 0.1 mg/L, u medij je dodana giberelinska kiselina (GA₃) u koncentraciji 0.2 mg/L kako bi se ispitao učinak povećane koncentracije GA₃ na mikropropagaciju merale.

U medij je također dodan PPM (Plant Preservative Mixture) u koncentraciji 1 ml/L medija.

U jednoj supkultivaciji umjesto Bacto agara (Difco) korišten je Plant agar (Duchefa), 7 g/L, kako bi se utvrdio utjecaj različite vrste agara na uspješnost mikropropagacije.

Kako je kontaminacija bakterijom bila glavni problem tijekom uspostavljanja *in vitro* kulture merale, većina supkultivacija (medija) rađena je s dodatkom Plant Preservative mixture – PPM). Nakon više supkultivacija na PPM-u bakterija više vizualno nije bila uočljiva te je postavljen pokus za mikropropagaciju merale bez PPM-a kako bi se utvrdio eventualni inhibitorski učinak ovog preparata na multiplikaciju ili dužinu izdanaka.

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

Tablica 3. Korišteni mediji te njihov sastav.

EM – uspostavni medij	MS (Murashige i Skoog, 1962) makro i mikroelementi, ali s 2x više $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, MS vitamini, 0.1 g/L inozitola, 30 g/L saharoze, 1 mg/L BAP, 0.3 mg/L indolil-3-maslačne kiseline (IBA), 0.1 mg/L giberelinske kiseline (GA_3), Bacto-agar (Difco) 8 g/L, pH 5,8
PM – medij za proliferaciju	MS + 50% više $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 50% više $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L inozitola, 30g/L saharoze, 0.1 mg/L indolil-3-maslačne kiseline (IBA), 0.1 mg/L giberelinske kiseline (GA_3), Bacto-agar (Difco) 8 g/L, pH 5,8 u varijantama s:
	1 mg/L BAP (PM BAP 1)
	1 mg/L mT (PM mT 1)
	0.3 mg/L BAP (PM BAP 0,3)
	0.3 mg/L mT (PM mT 0,3)
	Bez regulatora rasta (PM HF)
RM – medij za ukorjenjivanje	MS + 50% više $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 50% više $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L inozitola, 30g/L saharoze, Bacto-agar (Difco) 8 g/L, pH 5,8 u varijantama s:
	Bez regulatora rasta (RM HF) ili s dodatkom
	2 mg/L NAA (RM NAA)
	2 mg/L IBA (RM IBA)
	2 mg/L IAA (RM IAA)

3.4. Plan pokusa i statistička analiza podataka

Pokusi mikropropagacije koji su imali za cilj utvrditi utjecaj vrste agara, PPM-a i koncentracije giberelinske kiseline na proliferaciju merale bili su postavljeni kao jednofaktorijalni s najmanje 27 od 54 analiziranih eksplantata po varijanti. Podatci jednofaktorijelnih pokusa podvrgnuti su jednosmjernoj analizi varijance (ANOVA).

Pokus mikropropagacije u kojem je utvrđivan utjecaj vrste i koncentracije citokinina postavljen je kao višefaktorijelni s najmanje 45 eksplantata po kombinaciji (citokinin x koncentracija). Za utjecaj različitih citokinina u podlozi (BAP i mT) i njihovih različitih koncentracija (1 mg/L i 0.3 mg/L) provedena je dvosmjerna analiza varijance (pokus 2x2). Provedena je i dodatna jednosmjerna analiza varijance za učinak pet tretmana i to: četiri kombinacije citokinina x koncentracija te isti takav medij bez hormona-PM HF na svojstva mikropropagacije. Srednje vrijednosti uspoređene su Duncan-ovim testom na razini signifikantnosti $P \leq 0,05$. Podatci su analizirani programskim paketom SAS 9.2 (SAS, 2010).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Utjecaj vrste agara na uspješnost mikropropagacije

Prema našim rezultatima vidljiva je visoko signifikantna razlika uspješnosti mikropropagacije prema vrsti agara (Tablica 4). Sva analizirana svojstva imala su više vrijednosti na Plant agaru (Duchefa) u odnosu na Bacto agar (Difco) (Tablica 5).

Na Plant agaru broj izdanaka po eksplantatu bio je 4.2; najduži izdanak iznosio 10.7 mm, a prosječna dužina izdanaka bila je 7.6 mm (slika 10).

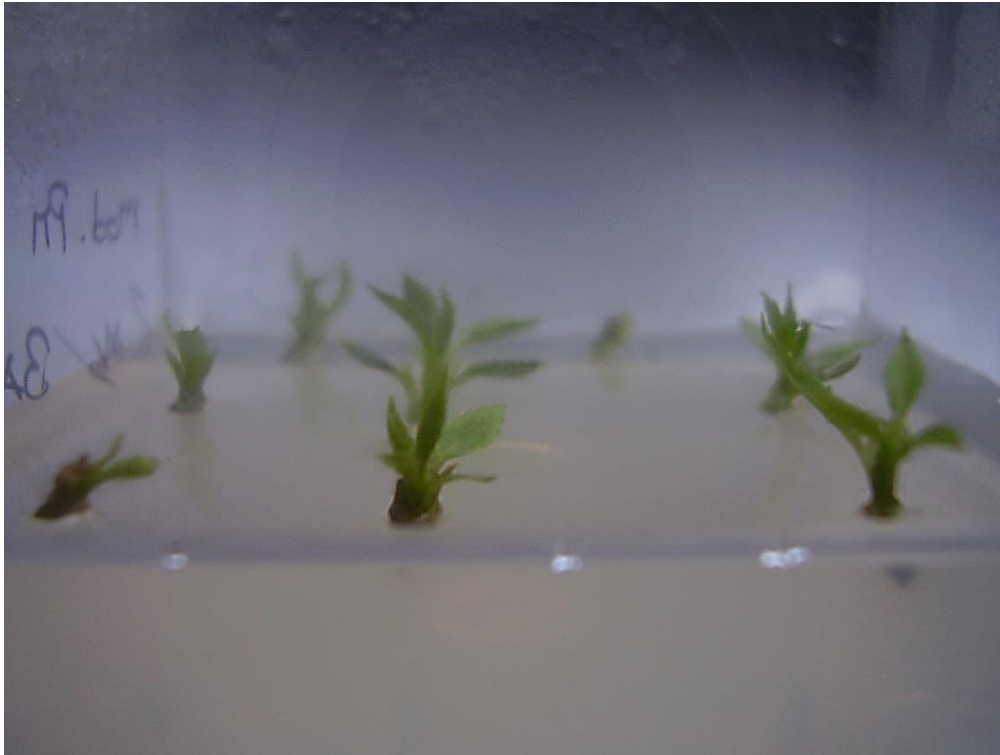
Sredstva za želiranje, prema ovim rezultatima, snažno utječu na rast i razvoj eksplantata i čini se nisu samo inertne tvari. Do istih spoznaja došli su Buah i sur. (1999) koji su uočili da tip i koncentracija sredstva za želiranje u mediju utječe na proliferaciju izdanaka banane. U njihovom radu korištena su 3 tipa sredstva za želiranje: agar, gelrit i gellan guma. Prema rezultatima optimalna koncentracija za rast bila je 0.9 g/L za gelrit, 6g/L za agar i 2g/L za gellan gumu. Veće koncentracije agara (8g/L) ili 6g/L za gellensku gumu nisu bile pogodne za rast izdanaka banana. Broj izdanaka bio je znatno pod utjecajem koncentracije sredstva za želiranje. Broj izdanaka na 6g/L agara bio je 5 a najveći broj izdanaka postignut je na 0.9 g/L gerlita (5,5)

Tablica 4 . Značajnost efekta ($Pr > F$) za analizirana svojstva uspješnosti mikropropagacije u ovisnosti o vrsti agara.

Izvor varijabilnosti	DF	Broj izdanaka po eksplantatu		Dužina najdužeg izdanka		Prosječna dužina izdanka	
		F Value	Pr > F	F Value	Pr > F	F Value	Pr > F
Vrsta agara	1	4.76	0.0326	34.68	<.0001	31.53	<.0001

Tablica 5 . Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o vrsti agara u mediju.

Vrsta agara	Broj izdanaka po eksplantatu	Dužina najdužeg izdanka (mm)	Prosječna dužina izdanka (mm)
Plant agar	4.2 A	10.7 A	7.6 A
Bacto agar	3.1 B	6.4 B	4.9 B



Slika 10. Mikropropagirani izdanci merale na mediju s Plant agarom

Foto: Snježana Kereša

4.2. Utjecaj vrste i koncentracije citokinina na uspješnost mikropropagacije

Iz Tablice 6. vidljivi su rezultati ovisnosti ispitivanih svojstva o citokinima i koncentraciji. Analiza varijance pokazala je da vrsta citokinina, koncentracija te njihova interakcija imaju značajan učinak na broj izdanaka po eksplantatu .

Tablica 6. Značajnost efekta ($Pr > F$) za analizirana svojstva uspješnosti mikropropagacije u ovisnosti o vrsti i koncentraciji citokinina.

Izvor varijabilnosti	DF	Broj izdanaka po eksplantatu		Dužina najdužeg izdanka		Prosječna dužina izdanka	
		F Value	Pr > F	F Value	Pr > F	F Value	Pr > F
Citokinin	1	17.57	<.0001	1.84	0.1758	0,08	0.7729
Koncentracija	1	183.99	<.0001	20.96	<.0001	69,36	<.0001
Citokinin x koncentracija	1	13.76	0.0003	1.97	0.1622	0,41	0.5249

Najboljim citokininom (prosjeak za nižu i višu koncentraciju) pokazao se mT (3.1), iza njega je BAP s 2.2, a najlošijim kontrola (HFM) to je ujedno i očekivano (Tablica 7).

Na dužinu najdužeg izdanka i prosječnu dužinu izdanaka vrsta citokinina nije signifikantno utjecala kao ni interakcija citokinina i njihove koncentracije. Koncentracija citokinina je jedina pokazala da ima značajan utjecaj na ova dva svojstva.

Dužina najdužega izdanka bila je najveća na mT (11.1 mm) iako se vrijednosti na BAP-u i kontroli nisu signifikantno razlikovale. Prosječno najduži izdanci bili su na kontrolnom mediju, međutim kako na kontrolnom mediju (HFM) merala gotovo uopće nije mikropropagirala, izdanak je to mogao iskoristiti za rast u visinu. Ipak, kontrolni medij (HFM) se nikako ne može preporučiti za mikropropagaciju ove vrste jer, osim što na njemu nije bilo proliferacije izdanaka, izdanci su i vrlo brzo žutjeli i propadali. Naši rezultati ukazuju na to da se meta-Topolin pokazao kao bolji hormon u broju izboja, ali da nema razlike između njega i BAP-a ako gledamo preostala dva svojstva.

Mnogi autori u svojim radovima koriste jedan ili drugi izvor hormona. Tako Mehmet Nuri Nas i sur. (2012) navode da je BAP citokinin koji se koristi češće dok je mT rijetko korišten u mikropropagaciji drvenastih kultura.

Kószeghi i sur. (2014) istraživali su utjecaj mT i BAP-a na mikropropagaciju bosiljka. Njihovi rezultati pokazali su da je značajno veći broj glavnih izboja formiran na mT što je u skladu s našim rezultatima. Međutim, u radu ove grupe autora dužina bočnih izboja također je bila veća na mT. Prednost koju Kószeghi i sur. (2014) ističu kod korištenja mT je smanjena hiperhidracija izdanaka.

Fira i sur. (2014) također su uspoređivali biljne hormone iz skupine citokinina. Prema njima BAP 1 mg/L dao je prosječne rezultate u proliferaciji izdanaka *Lonicera kamtschatica* dok su lošiji rezultati postignuti na tretmanu s mT na istoj koncentraciji u odnosu na BAP. Najlošiji rezultat zabilježili su na 1 mg/L zeatina gdje je uočeno stvaranje kalusa.

Parris i sur. (2012) u svome radu na magnoliji sorte 'Ann' koristili su BAP i mT, ali u različitim koncentracijama (2, 4 i 8 μ M). Prema njihovim rezultatima razlike u mikropropagaciji su visoko signifikantne o ovisnosti o citokininima, ali koncentracija i interakcija između citokinina i njihove koncentracije pokazala se nesignifikantnom. Najveći broj izboja dobili su na 4 μ M BAP (2.6), a na mT 8 μ M 1.8 izboj po eksplantatu. Dužina izboja također je bila veća na BAP nego na mT. Najduži izdanak na BAP bio je 20.9 mm, ali na koncentraciji od 8 μ M BAP-a. mT je imao najduže izdanke od 15,7 mm na koncentraciji od 4 μ M.

U radu Mehmeta Nuri i sur. (2012) na biljnoj vrsti azarola (*Crataegus aronia*) BAP se je također pokazao bolji (efektivniji u proliferaciji izboja) u odnosu na mT tj. producirao je duže izboje od mT.

Problem pri korištenju velikih koncentracija BAP-a je i pojava hiperhidracije izdanaka. S hiperhidracijom susreli su se mnogi autori. Fira i sur. (2014) u svojim radovima navode da osim hiperhidracije javljaju se problemi smanjene proliferacije, kratkih izboja, fizioloških problema kao nekroze za koje je potrebno poboljšanje u budućnosti u tehnikama mikropropagacije.

Kad je u pitanju utjecaj koncentracije na broj izdanaka, viša koncentracija od 1 mg/L (bilo kojeg citokinina) pokazala je značajno bolji rezultat u odnosu na 0.3 mg/L i 0. Između 0 i 0.3 mg/L nije bilo razlika.

Dužina najdužega izdanka bila je najveća na koncentraciji od 0.3 mg/L (prosječno za BAP i mT) te je iznosila 12.2 mm. Između koncentracija 0 (10.2 mm) i 1 mg/L (9.5 mm) nije bilo razlike u poticanju izduživanja izdanaka. Prosječno najduži izdanak bio je također na koncentraciji od 0.3 mg/L u iznosu od 11.2 mm. Uz tu koncentraciju, koncentracija 0 dala je drugi najbolji rezultat 10.1 mm te između 0 i 0.3 ne postoji značajna razlika. Najlošiji rezultat (za dužinu izdanaka) postignut je na koncentraciji od 1 mg/L u iznosu od 6.5 mm.

Tablica 7 . Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o vrsti i koncentraciji citokinina u mediju

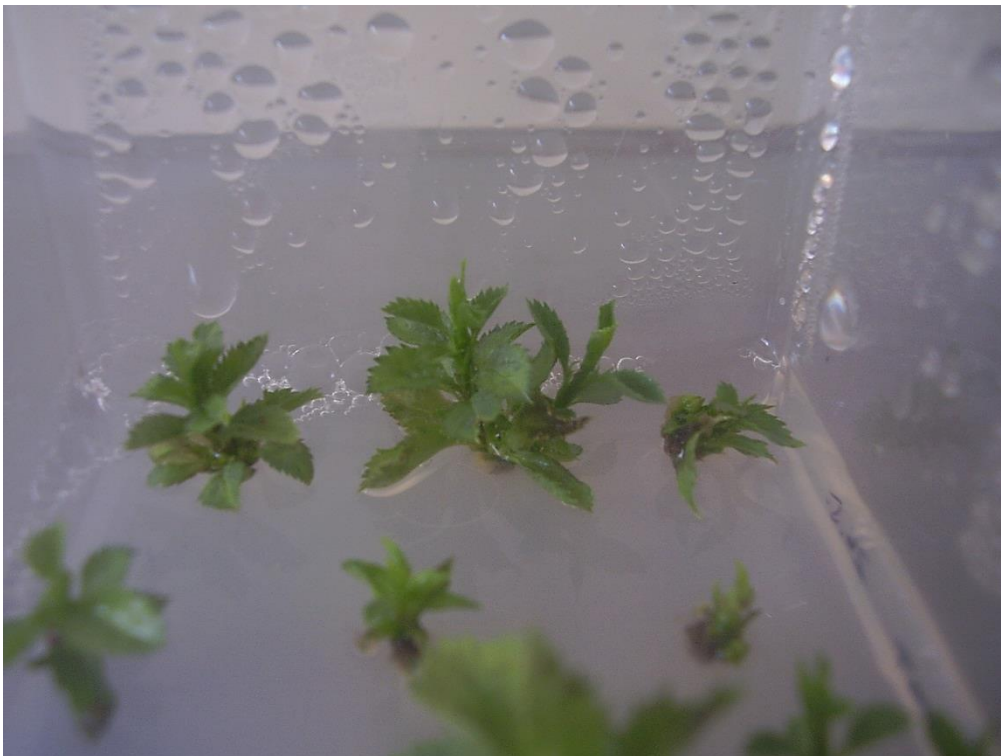
		Broj izdanaka po eksplantatu	Dužina najdužeg izdanka	Prosječna dužina izdanka
Citokinini	BAP	2.2 B	10.5 A	8.9 A
	HFM	1.0 C	10.2 A	10.1 A
	mT	3.1 A	11.1 A	8.8 A
Koncentracija	0	1.0 B	10.2 B	10.1 A
	0.3 mg/L	1.4 B	12.2 A	11.2 A
	1 mg/L	4.0 A	9.5 B	6.5 B

Kako je za broj izdanaka interakcija vrste i koncentracije citokininina (tretman) bila signifikantna, Duncan-ovim testom međusobno su uspoređene vrijednosti broja izdanaka po eksplantatu po tretmanima (Tablica 8).

Najveći broj izdanaka (4.7) dobiven je na mediju s dodatkom mT 1 mg/L (Slika 11) kojeg slijedi BAP 1 mg/L s 3.2 izdanaka po eksplantatu. mT i BAP u koncentracijama 0.3 mg/L kao i HFM dali su značajno lošije rezultate koji se međusobno nisu razlikovali

Tablica 8. Utjecaj tretmana (citokinin x koncentracija) na broj izdanaka po eksplantatu

Tretman	Broj izdanaka
mT 1	4.7 A
BAP 1	3.2 B
mT 0.3	1.5 C
BAP 0.3	1.4 C
MS HFM	1.0 C



Slika 11. Izdanci merale na mediju s 1 mg/L mT

Foto: Snježana Kereša

4.3. Utjecaj različitih koncentracija giberelinske kiseline na mikropropagaciju

Giberelinska kiselinu u koncentraciji od 0.1 i 0.2 mg/L nije bila presudan faktor za broj izdanaka po eksplantatu (Tablica 9).

Međutim, koncentracija od 0.2 mg/L dala je značajno bolje rezultate za ostala dva ispitivana svojstva (Tablica 9.) Dužina najdužeg izdanka iznosila je na toj koncentraciji 8.5 mm, a prosječna dužina 6.2 mm (Tablica 10.) što se je pokazalo kao signifikantno bolji rezultat u odnosu na koncentraciju od 0.1 mg/L GA₃ u mediju.

Primarna zadaća giberelina u mikropropagaciji je izduživanje stabljika, to je dokazano ovim istraživanjem, ali i drugi autori također su došli do tog zaključka. Tako je u radu skupine autora Ullah i sur. (2012) koji su koristili različite koncentracije GA₃ (0.1, 0.25 i 0.5 mg/L) u mikropropagaciji krumpira vidljivo izduživanje izboja povećanjem koncentracije GA₃, a najduži izboji (8,3 mm) bili su na koncentraciji od 0.25 mg/L.

Tablica 9 . Značajnost efekta (Pr > F) za analizirana svojstva uspješnosti mikropropagacije u ovisnosti o količini GA₃.

Izvor varijabilnosti	DF	Broj izdanaka po eksplantatu		Dužina najdužeg izdanka		Prosječna dužina izdanka	
		F Value	Pr > F	F Value	Pr > F	F Value	Pr > F
Koncentracija GA ₃	1	0,06	0,8129	18,03	<.0001	13,09	0,0005

Tablica 10. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o količini GA₃ u mediju

Koncentracija GA ₃	Broj izdanaka po eksplantatu	Dužina najdužeg izdanka	Prosječna dužina izdanka
GA ₃ 0.2 mg/L	3.2 A	8.5 A	6.2 A
GA ₃ 0.1 mg/L	3.1 A	6.4 B	4.9 B

4.4. Utjecaj PPM-a na mikropropagaciju

Provedeni pokus pokazao je da korištenje PPM-a nije značajno utjecalo na broj izdanaka po eksplantatu i prosječnu dužinu izdanaka (Tablica 11).

Broj izdanaka po eksplantatu (4.2) bio je veći s PPM-om, ali nije bilo signifikantne razlike kad je PPM korišten ili bez njega. Izdanci najveće prosječne dužine bili su na tretmanu bez PPM-a (8.9 mm), ali ni u ovom slučaju nema signifikantne razlike između korištenja i ne korištenja PPM-a. PPM u podlozi je signifikantno utjecao jedino na dužinu najdužeg izdanka, te je bolji rezultat postignut bez korištenja PPM-a (13.3 mm) (Tablica 12).

Tablica 11. Značajnost efekta ($Pr > F$) za analizirana svojstva uspješnosti mikropropagacije u ovisnosti o prisustvu PPM-a.

Izvor varijabilnosti	DF	Broj izdanaka po eksplantatu		Dužina najdužeg izdanka		Prosječna dužina izdanka	
		F Value	Pr > F	F Value	Pr > F	F Value	Pr > F
PPM	1	3.54	0.0636	4.51	0.0369	2,54	0.1152

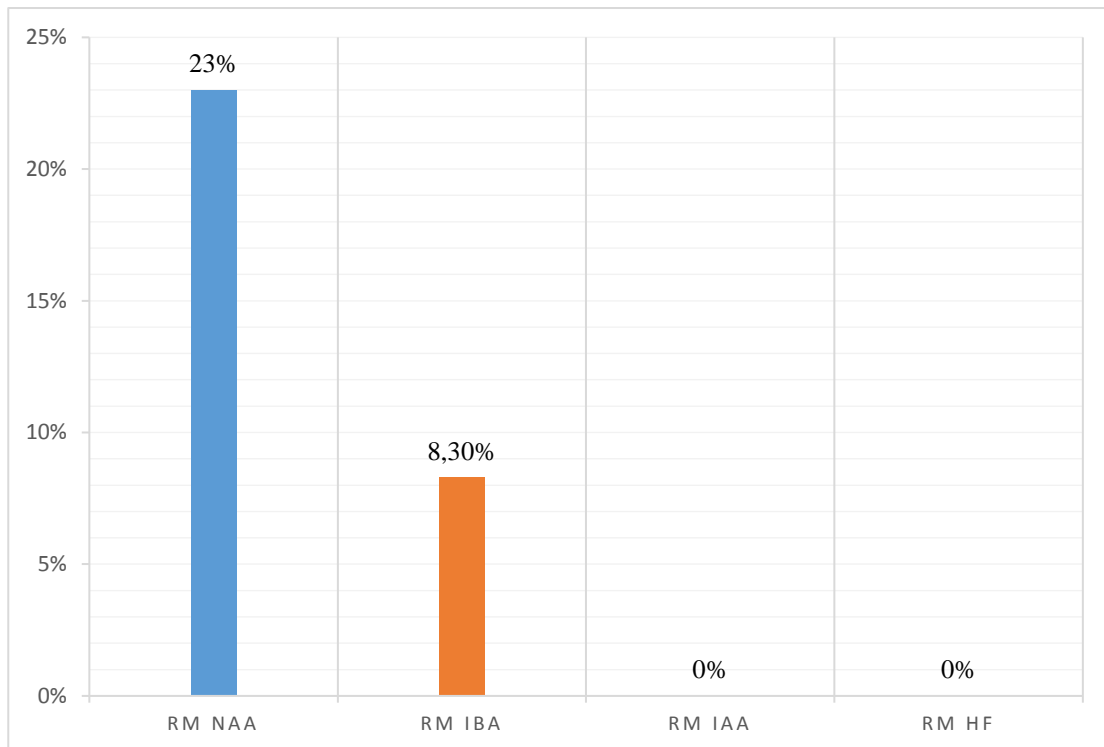
Tablica 12. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o prisustvu PPM-a u agaru.

PPM	Broj izdanaka po eksplantatu	Dužina najdužeg izdanka	Prosječna dužina izdanka
S PPM-om	4.2 A	10.7 B	7.6 A
Bez PPM-a	3.3 A	13.3 A	8.9 A

Silveira i sur. (2016) u svojem radu navode da je upotreba PPM-a bez obzira na koncentraciju bila vrlo učinkovita protiv bakterija. Osim toga, navode da povećanje koncentracija može dovesti do povećanog rasta tkiva i posljedičnog povećanja proizvodnje fenolnih spojeva. Međutim, upotreba 2% PPM-a može dovesti do toksičnosti i inhibicije rast izboja *Citrus sinensis*. Toksičnost PPM-a je niska, ali povećanjem koncentracije povećava se i toksičnost. Jednaki zaključak donose Babaei i sur. (2013).

4.5. Zakorjenjivanje

Na zakorjenjivanje je postavljeno ukupno 228 biljaka koje su prethodno mikropropagirale na korištenim medijima. Od ukupnog broja biljaka zakorjenilo je svega 28 biljaka i to na tretmanima NAA (1-naftalenoctena kiselina) i IBA (Indol-3-maslačna kiselina)



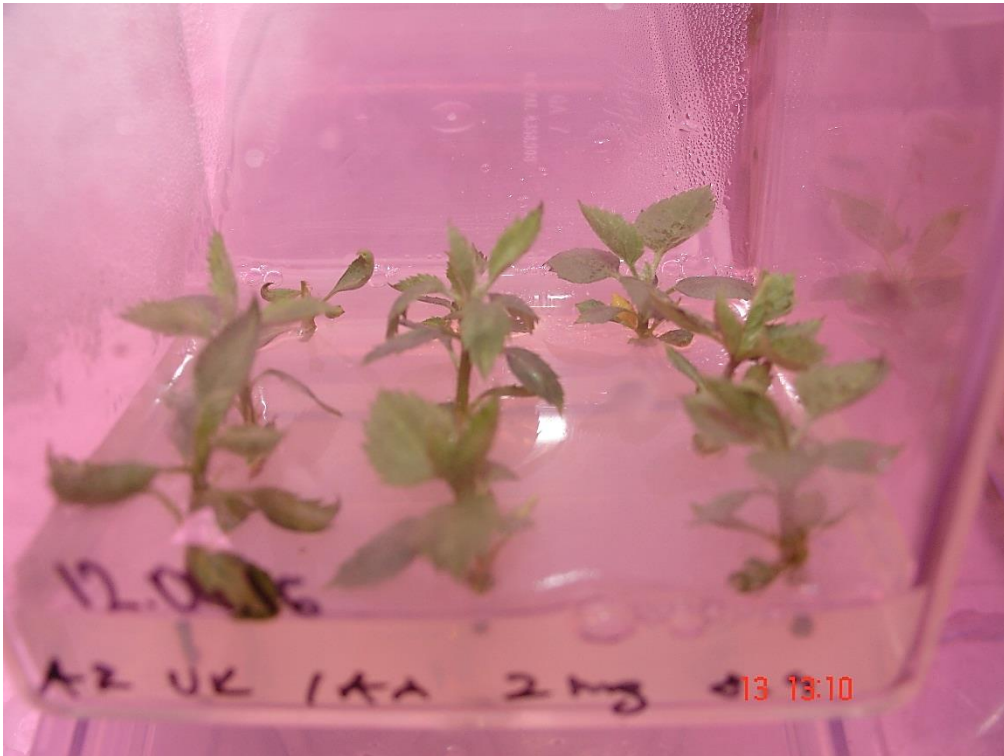
Graf 1. Postotak zakorjenjivanja merale na različitim regulatorima rasta u hranidbenoj podlozi.

Prema postotku zakorjenjivanja najveći postotak bio je na tretmanu NAA u iznosu od 23%. Samo 8% biljaka zakorjenilo je na IBA dok na IAA i HFM nije zabilježena niti jedna zakorjenjena biljka (Graf 1). Iz vidljivih rezultata možemo reći da je regulator rasta u hranidbenoj podlozi utjecao na postotak zakorjenjivanja. Na Slici 12. prikazani su izdanci merale u pokusu zakorjenjivanja.

Autori Alosaimi i Tripepi (2015) u svome radu na *Amelanchier alnifolia* ispitivali su sposobnost stvaranja korijena na regulatorima rasta NAA i IBA i pri koncentracijama od 0, 0.5, 1, 5, i 10 μ M. Najbolji rezultati postignuti su na 10 μ M IBA i 10 μ M NAA, a postotak formiranja korijena bio je 33% na IBA i 67% na NAA. Usporedno s ovim podatcima dolazimo do istog rezultata. Iako rezultat našeg zakorjenjivanja mali (23%) u usporedbi sa 67% na NAA tretmanu, možemo zaključiti da NAA je pogodan hormon za zakorjenjivanje merale.

Njihova studija pokazala je da je visoka koncentracija IBA ili NAA pogodna za stvaranje korijena kod merale u *in vitro* uvjetima.

Pruski i sur. (2000) navode da kombinacija IBA I NAA daje uspješnost od 84% pri zakorjenjivanju voćnih vrsta iz porodice Prunus (*P. virginiana* i *P. pensylvanica*). Osim auksina, koristili su se i komercijalnim prahom za zakorjenjivanje „Rootone F“ koji je imao uspješnost zakorjenjivanja od 75%.



Slika 12. Tretman zakorjenjivanja merale na hranidbenoj podlozi sa IAA hormonom.

Foto: Snježana Kereša

5. Zaključak

Uspješno je provedena mikropropagacija merale (*Amelanchier alnifolia*) u *in vitro* uvjetima na MS hranidbenoj podlozi uz dodatak citokinina kao regulatora rasta. Ispitivan je utjecaj dvaju različitih vrsta agara, vrste i koncentracije citokinina, različitih koncentracija giberelinske kiseline (GA_3) kao i utjecaj PPM-a na uspješnost mikropropagacije. Preliminarno je također ispitan utjecaj različitih vrsta auksina na zakorjenjivanje. Mjerena svojstva bila su broj izdanaka po eksplantatu, duljina najduljega izdanaka i prosječna duljina svih izdanaka. Na temelju provedenog istraživanja i rezultata, donesen je sljedeći zaključak:

1. Plant agar pokazao se je značajno bolji za mikropropagaciju merale od Bacto agara.
2. Vrsta citokinina bila je značajan faktor jedino za broj izdanaka, dok je koncentracija citokinina bila značajna za dužinu izdanaka. Najveći broj izdanaka (3.1) (prosječno za obadvije korištene koncentracije) postignut je na hormonu mT, ali je najduži izdanak dobiven na BAP tretmanu (10.5 mm). Koncentracija od 1 mg/L je pogodnija za postizanje što većeg broja izdanaka, a male koncentracije kao 0 i 0.3 dale su manji broj izdanaka. Za izduživanje izdanaka pogodnija je niža koncentracija citokinina. Kao najbolji tretman (vrsta citokinina x koncentracija) za postizanje velikog broja izdanaka (4.7) pokazao se je mT u koncentraciji 1 mg/L.
3. Giberelinska kiselina čiji je primarni zadatak izduživanje stanica nije utjecala na broj izdanaka, ali koncentracija GA_3 od 0.2 mg/L postigla je bolje rezultate od koncentracije 0.1 mg/L, što je i očekivano.
4. Korištenje PPM-a kao antibiotskog sredstva nije pokazalo nikakav značajan utjecaj u ovome radu. Naime, nema signifikantne razlike u korištenju PPM-a u broju izdanaka i prosječnoj duljini. Jedino gdje se pokazala signifikantna razlika je u dužini najdužeg izdanaka te je ona bila veća na tretmanu bez PPM-a.
5. Najbolji uspjeh zakorjenjivanja (28%) postignut je na hranidbenoj podlozi s 1-naftalenoctenom kiselinom (NAA).

Možemo na kraju zaključiti da sastojci medija kao što su agar, citokinini u različitim koncentracijama i giberelinska kiselina imaju utjecaj na mikropropagaciju merale. Dobiveni rezultati mikropropagacije vjerojatno bi se mogli još poboljšati optimizacijom protokola, a pokuse zakorjenjivanja za kojeg su provedena samo preliminarna istraživanja treba ponoviti te uvesti još tretmana jer tretmani korišteni u ovom istraživanju nisu dali zadovoljavajuće rezultate.

6. Popis literature

1. Abobkar I.M. Saad and Ahmed M. Elshahed (2012). Plant Tissue Culture Media, Recent Advances in Plant in vitro Culture, Dr. Annarita Leva (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/50569. Available from: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media>
2. Alosaimi, A.A. and Tripepi, R.R. (2015). Micropropagation of a selected clone of *Amelanchier alnifolia*©. *Acta Hort.* 1140, 297-298 DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1140.66
3. Babaei N. Abdullah NAP. Saleh G. Abdullah TL. Control of contamination and explant browning in *Curculigo latifolia* in vitro cultures. *J Med Plants Res.* 2013;7(8):448–454
4. Bairu, M. W., Wendy A. Stirk, Karel Dolezal, Johannes Van Staden (2007). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90:15–23
5. Buah J. N., Kawamitsu Y., Sato S., Murayama S. (1999) Effects of Different Types and Concentrations of Gelling Agents on the Physical and Chemical Properties of Media and the Growth of Banana (*Musa* spp.) in Vitro, *Plant Production Science*, 2:2, 138-145
6. Compton M.E. and Koch J.M. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM)™ on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 259-261, 2001.
7. Fira Al., Doina Clapa, Victoria Cristea, Catita Plopa (2014) In vitro propagation of *Lonicera kamtschatica*. *Agriculture - Science and Practice* no. 1- 2(89-90)/2014
8. Jelaska, S. (1994.). *Kultura biljnih stanica i tkiva*. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga.
9. Juríková, T.; Balla, S.; Sochor, J.; Pohanka, M.; Mlcek, J.; Baron, M. Flavonoid Profile of Saskatoon Berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) and Their Health Promoting Effects. *Molecules* 2013, 18, 12571-12586.
10. Kőszeghi, S., Bereczki C., Balog A., Benedek K. (2014) Comparing the Effects of Benzyladenine and meta-Topolin on Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) Micropropagation *Not Sci Biol*, 2014, 6(4):422-427. DOI:10.1583/nsb649464
11. Lawyer Nursery 2012, https://lawyernursery.com/PDF_static/articles/2012_Feb_Saskatoons.pdf
12. Mehmet N. N., Leyla Gokbunar, Nevzat Sevgin, Murat Aydemir, Merve Dagli, Zahide Susluoglu (2012) Micropropagation of mature *Crataegus aronia* L., a medicinal and ornamental plant with rootstock potential for pome fruit Springer Science+Business Media B.V. 2012

13. Murashige T. i Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
14. Parris, J.K., D.H. Touchell, T.G. Ranney, and J. Adelberg. 2012. Basal salt composition, cytokinins, and phenolic binding agents influence in vitro growth and ex vitro establishment of Magnolia Ann. HortScience 47:1625-1629.
15. Plant cellt echnology <https://www.plantcelltechnology.com/about-ppm/>
16. Podlešáková, K., David Zalabák, Mária Čudejková, Ondřej Plíhal, Lucie Szüčová, Karel Doležal, Lukáš Spíchal, Miroslav Strnad, Petr Galuszka (2012). Novel Cytokinin Derivatives Do Not Show Negative Effects on Root Growth and Proliferation in Submicromolar Range. *PLoS ONE* 7(6): e39293.
17. Pruski K., Mohyuddin M., Grainger G. (1991) Saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). In: Bajaj Y.P.S. (eds) Trees III. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 16. Springer, Berlin, Heidelberg
18. Pruski, K. W., Lewis, T., Astatkie, T., Nowak, J., 2000. Micropropagation of chokecherry and pincherry cultivars. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 63, 93- 330 100.
19. Rajasekharan, P. E. (2015). Gene Banks for *Ex Situ* Conservation of Plant Gentic Resources. Vol. 2: Plant Genomics and Biotechnology, Springer, India 2015.
20. Remphrey, W. R. and L.P. Pearn .2006. A comparison of seed-propagated and micropropagated *Amelanchier alnifolia* (Saskatoon): Yield and yield components in relation to crown architecture characteristics. *Can. J. Plant Sci.* 86: 499– 510.
21. Rihan H. Z., Mohammed Al-Issawi, Fadil Al-swedi, Michael P. Fuller (2012). The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. *Scientia Horticulturae* 141 47– 52
22. Rihan, H.Z.; Al-Issawi, M.; Al-Swedi, F.; Fuller, M.P. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. *Sci. Hortic.* 2012, 141, 47–52.
23. SAS/STAT (2010). SAS Institute, Cary, NC, USA.
24. Silveira, S.S., Cordeiro-Silva, R., Degenhardt-Goldbach, J., & Quoirin, M.G. (2016). Micropropagation of *Calophyllum brasiliense* (Cambess.) from nodal segments. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 76 3, 656-63.
25. Spencer, R., Matthews, L., Bors, B., Peters, C. (2013) Saskatoon berry production manual. Alberta Agriculture and Rural Development [https://www1.agric.gov.ab.ca/\\$Department/deptdocs.nsf/all/agdex14362/\\$FILE/238_20-2.pdf](https://www1.agric.gov.ab.ca/$Department/deptdocs.nsf/all/agdex14362/$FILE/238_20-2.pdf)

26. St-Pierre, R. G. 2005. An introduction to growing saskatoons. Praire elements, Saskatoon, Canada, p. 1-3.
27. Tiwari, D.K., P. Pandey, S.P. Giri and J.L. Dwivedi, 2011. Effect of gibberellic acid (GA3) and other plant growth regulators on hybrid rice seed production. Asian J. Plant Sci., 10: 133–139
28. Ullah I., Mubashar Jadoon, Anayat ur Rehman, Tahseen Zeb and Khalid Khan, 2012. Effect of Different GA3 Concentration on in vitro Propagation of Potato Variety Desiree. Asian Journal of Agricultural Sciences, 4(2): 108-109.
29. Werbrouck S., M. Strnad, H. Van Onckelen & P. Debergh (1996). Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture. Physiologia plantarum 98:291-297

7. Prilog

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu

ANOVA	Analiza varijance
BAP	6-benzilaminopurin
GA ₃	Giberelinska kiselina
IBA	Indol-3-maslačna kiselina
LSD	Najmanja značajna razlika
MS	Murashige i Skoog medij
mT	Metatoplin
NAA	1-naftalenoctena kiselina
PPM	Plant Preservative Mixture

Životopis

Antonio Pavičić rođen je 27. kolovoza 1993 godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađao je u Krapinskim Toplicama. Srednjoškolsko obrazovanje pohađao je u Pregradi u strukovnoj školi.

Započinje preddiplomski studij Biljnih znanosti 2012. godine na Agronomskome fakultetu u Zagrebu te ga završava 2015. godine sa završnim radom na temu „Fizikalne i kemijske odlike pčelinjeg voska“ pod mentorstvom prof. dr. sc. D. Bubala. Po završetku preddiplomskog studija upisuje diplomski studij Biljnih znanosti na Agronomskom fakultetu.

Stručnu praksu odrađivao je na Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku također pod mentorstvom prof. dr. sc. S. Kereša.

Godine 2018. u sklopu CEEPUS programa ostvaruje pravo razmjene studenata u trajanju od 3 mjeseca na „Vysoká škola chemicko-technologická“ u Pragu.

Aktivno se služi engleskim jezikom.