Regeneracija istarkih ekotipova češnjaka somatskom embriogenezom

Kurtović, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:647977

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

REGENERACIJA ISTARSKIH EKOTIPOVA ČEŠNJAKA SOMATSKOM EMBRIOGENEZOM

DIPLOMSKI RAD

Katarina Kurtović

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Biljne znanosti

REGENERACIJA ISTARSKIH EKOTIPOVA ČEŠNJAKA SOMATSKOM EMBRIOGENEZOM

DIPLOMSKI RAD

Katarina Kurtović

Mentor:

prof.dr.sc. Snježana Kereša

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Katarina Kurtović**, JMBAG 01781030965, rođena 05.11.1995. u Sisku, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

REGENERACIJA ISTARSKIH EKOTIPOVA ČEŠNJAKA SOMATSKOM EMBRIOGENEZOM

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

_____
Potpis studenta / studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Katarina Kurtović**, JMBAG 01781030965, naslova

REGENERACIJA ISTARSKIH EKOTIPOVA ČEŠNJAKA SOMATSKOM EMBRIOGENEZOM

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. Sanja Radman	član	_____

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Hipoteza i ciljevi rada 2
2. Pregled literature 3
2.1. Podrijetlo i klasifikacija 3
2.2. Morfološke karakteristike 4
2.3. Kemijski sastav 5
2.4. Ekonomska važnost češnjaka u Hrvatskoj i svijetu 5
2.5. Biotehnološke metode na češnjaku 6
2.5.1. Kultura tkiva i mikropropagacija 6
2.5.2. Somatska embriogeneza (SE) 7
2.5.3. Somatska embriogeneza na različitim kulturama 10
2.5.4. Somatska embriogeneza na češnjaku 11
2.6. Virusi na češnjaku 13
2.7. Oslobođenje od virusa pomoću kulture tkiva 15
2.8. ELISA test – serološka metoda u detekciji virusa 16
3. Materijali i metode 17
3.1. Biljni materijal 17
3.2. Priprema hranidbenog medija 18
3.3. Uspostavljanje kulture 18
3.4. ELISA test 19
3.5. Statistička analiza podataka 20
4. Rezultati i rasprava 21
4.1. Somatska embriogeneza 21
4.2. Postotak embriogeneze i broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu 25
4.3. Uspješnost zakorjenjivanja 30
4.4. Postotak preživjelih biljaka nakon presađivanja u supstrat 32
4.5. Rezultati ELISA testa 34
4.6. Kalogeneza i embriogeneza na drugim tipovima eksplantata 38
5. Zaključci 39
6. Popis literature 40
Životopis 46

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Snježani Kereši na ukazanoj prilici i pomoći oko izrade diplomskog rada. Također, zahvaljujem se doc.dr.sc. Aniti Bošnjak Mihovilović i doc.dr.sc. Sanji Radman na savjetima i konstruktivnim prijedlozima.

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice Katarine Kurtović, naslova

REGENERACIJA ISTARSKIH EKOTIPOVA ČEŠNJAKA SOMATSKOM EMBRIOGENEZOM

Češnjak (*Allium sativum* L.) je poljoprivredna kultura koja se razmnožava vegetativno. To ga čini osjetljivim na razne bolesti, pogotovo na viruse koji se preko zaraženog materijala prenose u slijedeću generaciju i akumuliraju. U istraživanju regeneracije češnjaka somatskom embriogenezom korištena su dva istarska ekotipa (12 i 13) dobivena od Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču. Kao eksplantati su korištene baze češnja postavljene na dva hranidbena medija različitih sastava (MS i modificirani MS), a svaki od njih je imao dva različita sastava regulatora rasta. Kalogeneza je postignuta na oba ekotipa i svim tretmanima. Postotak embriogeneze je bio viši kod ekotipa 13, ali ne signifikantno različit od ekotipa 12. Broj regeneriranih biljaka se značajno razlikovao ($P<0,05$) između tretmana. Na tretmanu MS 2,4 D je bilo najviše regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu u oba ekotipa. Uspješno je zakorijenjeno i posađeno u supstrat 239 regeneriranih biljaka od kojih je 70% preživjelo. Pomoću ELISA metode je provedena laboratorijska detekcija četiri virusa: virus žućenja i kržljavosti luka (OYDV), virus žute prugavosti poriluka (LYSV), obično latentni virus češnjaka (GCLV) i latentni virus kozjaka (SLV). Biljke regenerirane somatskom embriogenezom uspoređene su s matičnim biljkama. Od ukupno 82 ispitane regenerirane biljke, 16 ih je bilo potpuno oslobođeno od virusa, odnosno 19,5%. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je moguće pomoću somatske embriogeneze dobiti biljke oslobođene od virusa.

Ključne riječi: češnjak**,** regeneracija, somatska embriogeneza, oslobođenje od virusa

Summary

Of the master's thesis – student **Katarina Kurtović,** entitled

REGENERATION OF ISTRIAN ECOTYPES OF GARLIC THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS

Garlic (*Allium sativum* L.) is an agricultural crop which is propagated vegetatively. This makes garlic more susceptible to various diseases, especially viruses that are transmitted and accumulated through the infected material to the next generation. In the study of garlic regeneration by somatic embryogenesis two Istrian ecotypes (12 and 13) obtained from the Institute of Agriculture and Tourism in Poreč were used. Clove bases were used as explants and placed on two nutrient media of different compositions (MS and modified MS). Both media had also two different growth regulator compositions. Callogenesis was achieved on both ecotypes and all four treatments. The percentage of embryogenesis was higher for ecotype 13, but not significantly different than for ecotype 12. The number of regenerated plants differed significantly ($P<0,05$) between treatments. MS 2,4 D treatment had the highest number of regenerated plants per callus in both ecotypes. Successfully were planted and acclimatized 239 regenerated plants, of which 70% survived. Laboratory detection of four viruses was performed using the ELISA method, which included: onion yellow dwarf virus (OYDV), leek yellow stripe virus (LYSV), garlic common latent virus (GCLV) and shallot latent virus (SLV). Plants regenerated by somatic embryogenesis were compared with mother plants. Of the 82 regenerated plants tested, 16 were completely virus free (19,5%). The results of this study indicate that it is possible to obtain virus-free plants by somatic embryogenesis.

Keywords: garlic**,** regeneration, somatic embryogenesis, virus free

1. Uvod

Češnjak (*Alium sativum* L.) je poljoprivredna kultura iz roda *Allium,* kojem pripadaju i luk, poriluk, vlasac. Pripada jednosupnicama (monokotiledona) čiji je glavni ekonomski organ lukovica, sastavljena od ljuskom omotanih češnjeva (Stavelikova 2008.). Široko je rasprostranjen u svijetu, sve od umjerenih do suptropskih područja pa čak i borealnih područja (Hanelt 1990.). Danas se češnjak proizvodi najviše u istočnoj Aziji, Europi, zatim Sjevernoj i Južnoj Americi te u sjevernom dijelu Afrike (White i Zellner 2008.).

Češnjak se zbog intezivnog okusa i mirisa ne koristi kao povrće u užem smislu, već kao začin i dodatak jelima, a cijenjen je i kao ljekovita biljka. Medicinska upotreba češnjaka je stara preko 4,000 godina (Bhagyalakshmi i sur. 2005.). *Allium* vrste u svom kemijskom sastavu sadrže sumporne spojeve koji im daju karakterističnu aromu (Amagase 2006.). S obzirom na to da ima sterilno sjeme, u poljoprivrednoj proizvodnji razmnožava se vegetativno, lukovicama. U vegetativnom razmnožavanju pojavljuju se poteškoće kao što su smanjenje genetske varijabilnosti, niska brzina multiplikacije te zaraženost sjemenskog materijala bolestima. *In vitro* regeneracija somatskom embriogenezom ima mogućnost dobivanja većeg broja biljaka u odnosu na klasično razmnožavanje. Uspješnost *in vitro* regeneracije ovisi o tipu eksplantata, sastavu hranjivog medija te genotipu (Hassan i sur. 2014.).

Zbog vegetativnog razmnožavanja, zdravstveno stanje češnjaka je pogođeno primarnim i sekundarnim virusnim infekcijama koje se prenose u slijedeću generaciju i akumuliraju. Mehta i sur. (2013.) navode da je skoro sav sjemenski materijal češnjaka kontaminiran s jednim ili više patogena, većinski virusima koji igraju glavnu ulogu u smanjenju prinosa i kvalitete. Osim toga zaraženost virusima reducira sposobnost i dužinu trajanja skladištenja glavica. Rodovi virusa koji najčešće napadaju češnjak su *Potyvirus, Carlavirus,* i *Allexivirus*. Najveću opasnost predstavljaju virus žućenja i kržljavosti luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV), virus žute prugavosti poriluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV), obično latentni virus češnjaka (*Garlic common latent virus,* GCLV) te latenti virus kozjaka (*Shallot latent virus,* SLV).

Kod nekih biljnih vrsta je osim toplinskim postupkom i kulturom meristema postignuto oslobođenje od virusa i somatskom embriogenezom. Do sada nisu rađena istraživanja na regeneraciji češnjaka somatskom embriogenezom u svrhu oslobođenja od virusa. Optimizacijom protokola za pojedine ekotipove, somatska embriogeneza bi mogla postati metodom izbora.

1.1. Hipoteza i ciljevi rada

Hipoteza ovog rada je da će postojati signifikantne razlike u uspješnosti embriogeneze i regeneracije biljaka na različitim tretmanima.

Ciljevi rada

1. Ispitati uspješnost kalusiranja (kalogeneze), somatske embriogeneze i regeneracije dvaju ekotipova češnjaka na četiri različita tretmana u kulturi *in vitro*;

2. Dobiti bezvirusne biljke češnjaka pomoću somatske embriogeneze.

2. Pregled literature

2.1. Podrijetlo i klasifikacija

Rod *Allium* uključuje neke od najstarijih kutiviranih vrsta *A. sativum* (češnjak), *A. cepa* (luk), *A. schoenoprasum* (vlasac), *A. ampeloprasum* ssp. *porrum* (poriluk), *A. tuberosum* (kineski gomoljasti vlasac) (Block 2010.). *Allium* je široko rasprostranjen u toplo-umjerenim i umjerenim zonama sjeverne polutke, a pojavljuje se i u borealnoj zoni (Stavelikova 2008.). Unutar roda *Allium* se nalazi preko 750 vrsta. Velik broj vrsta indicira da se mnogo evolucijske diferencijacije pojavilo od nastanka roda (Hanelt 1990.). Dok se u nekim navodima tvrdi da je češnjak prvotno potekao iz južne Europe, većina istraživanja ukazuje na to da potječe iz centralne Azije (White i Zellner 2008.). Točnije, sjeverozapadna strana planine Tien Shan (Kirgistan i Kazahstan) se navodi kao vjerojatni centar podrijetla češnjaka (Etoh i Simon 2002.). Tamo je pronađen i fertilan češnjak.

Češnjak, luk i poriluk oduvijek su bili popularna hrana u Egiptu i na Mediteranu. Kineski zapisi ukazuju na to da je kultivacija češnjaka u Kini započela simultano s onom u Mezopotamiji (Block 2010.). Češnjak se smatrao hranom za jačanje, idealnom za radnike, veslače i vojnike. Rimljani su introducirali češnjak mnogim narodima koje su pokorili u Sjevernoj Europi. U botaničkom nazivu za češnjak "sativum" znači kultivirani, u skladu s činjenicom da je divlji "*A. sativum*" nepoznat. Dugo se smatralo da su *A. longicuspis* ili *A. tuncelianum* mogući preci, međutim DNA analize su to opovrgnule (Ipek i sur. 2008.).

Tablica 2.1.1. Sistematika češnjaka (*Allium sativum* L.)

TAKSONOMIJA	
Carstvo	Plantae
Divizija	Magnoliophyta
Razred	Liliopsida
Red	Asparagales
Porodica	Alliaceae
Rod	*Allium*
Vrsta	*A. sativum*

Izvor: White i Zellner (2008.)

Iako se vegetativno razmnožava, češnjak pokazuje veliku varijabilnost među klonovima koji su prilagođeni raznim klimatskim regijama zemalja u kojima se uzgaja. Domesticirane vrste su umjetno selekcionirane prvenstveno kako bi zadovoljile ljudske potrebe. Stoga su domestikacija i selekcija za veće lukovice te uklanjanje cvjetajućih biljaka potpomogle sterilnosti češnjaka. Još jedan čimbenik koji pridonosi seksualnoj sterilnosti češnjaka jest bila žetva češnjaka u vlažnim područjima prije cvjetanja tako da se spriječi truljenje lukovice u vlažnom tlu (Block 2010.).

2.2. Morfološke karakteristike

S obzirom na to da većina kultivara i ekotipova češnjaka ne cvate i ne donosi sjeme, reproduktivni organ češnjaka je lukovica (slika 2.2.1.). Lukovica se sastoji od 12 – 20 malih lučica, češnjeva u obliku polumjeseca koji su obavijeni čvrstom bijelom ili crvenkastom ljuskom, a kojih svaki može dati novu biljku (Matotan 2004., Lešić i sur. 2004.). Unutar češnja se nalazi klica sastavljena od 2 – 3 zametnuta lista.



Slika 2.2.1. Lukovica češnjaka

Izvor: Stavelikova (2008.)

U površinskom sloju tla se razvija slabo razgranato adventivno korijenje (Lešić i sur. 2004.). Prvi list je bez plojke dok se slijedeći listovi sastoje od linearne plojke i lisnog rukavca. Lisni rukavi tvore "lažnu stabiljiku" duljine 20 – 30 cm dok lisne plojke mogu dosegnuti visinu i do 50 cm. U pazuhu najmlađeg lista se pri završetku rasta zametne jedan pup, a u onima ispod njega pa sve do 4. lista po 1 do 6 pupova. Broj zametnutih pupova se smanjuje prema starijim listovima. Češnjevi se formiraju tako što se asimilati premiještaju iz listova tijekom vegetacije (Lešić i sur. 2004.). Kod nekih ekotipova se formira cvjetna stabljika koja moža narasti od 70 do 100 cm i završava štitastim cvatom koji je u početku obavijen ovojnim listom. Cvjetovi su sitni, a sastoje se od 6 prašnika i trogradno nadraslom plodnicom s više sjemenih zametaka. Plod češnjaka je tobolac. Sjemenke koje su uglavnom sterilne, crne su boje, okruglaste i vrlo sitne.

2.3. Kemijski sastav

Češnjak se stoljećima koristi u medicini, a njegova ljekovita svojstva se istražuju i danas. Glavna komponenta alicin, koji je zaslužan za specifičan miris češnjaka je prirodna obrana protiv insekata i patogena. Nakon ozljede biljni enzimi proizvode alicin koji služi kao zaštita protiv gljivičnih infekcija (Jones i Mann 1963.). Louis Pasteur je 1858. godine otkrio antimikrobna svojstva češnjaka. Pasteur je pokazao da razrijeđena otopina soka češnjaka može inhibirati rast patogenih bakterija kao što su *Staphlyococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* i *Vibrio cholera* sp., ali i kvasaca i drugih gljivica (White i Zellner 2008.). Dokazano je da alicin reducira koncentracije kolesterola, triglicerida, lipoproteina niske gustoće u krvi te inhibira rad enzima neophodnih za sintezu kolesterola.

U češnjaku se nalazi preko 2000 biološki aktivnih spojeva (Kim i sur. 2002.). Sulfatni spojevi uključujući alicin (dialil-disulfid-oksid) su utvrđeni kao glavne aktivne komponente u lukovici češnjaka (Mehta i sur. 2013.). Međutim, alicin kao takav se ne nalazi u češnjaku već se brzo sintetizira iz prekursora aliina djelovanjem alinaze nakon drobljenja tkiva (Bhagyalakshmi i sur. 2005.). U 100 grama svježe mase češnjaka 23 grama su ugljikohidrati, zatim proteini (4,4 g). Od minerala je je bogat fosforom (44 mg), kalcijem (5 mg) i željezom (0,4 g). Također bogat je i vitaminima poput riboflavina (0,03 mg), tiamina (0,24 mg), nikotinske kiseline (0,9 mg) i vitamina C. U njegovom kemijskom sastavu još se nalaze selen i germanij (Bhagyalakshmi i sur. 2005.).

Alicin ima široki spektar bioloških i farmakoloških djelovanja uključujući antikoagulantna, antihipertenzivna, antimikrobna, antibiotska, antiparazitska, antimikotička, antivirusna, antitumorska, antioksidativna djelovanja (Amagase 2006.).

2.4. Ekonomska važnost češnjaka u Hrvatskoj i svijetu

Prema posljednjim podacima FAOSTAT-a za 2017. godinu, u svijetu je proizvedeno više od 28 milijuna tona češnjaka, na površinama od preko 1,5 milijuna hektara. Najveći svjetski proizvođač je Kina s proizvedenih 22 milijuna tona na više od polovice površina ukupne svjetske proizvodnje. Po proizvedenoj količini slijede Indija, Bangladeš, Europska Unija i Egipat. U Europi su najveći proizvođači Rusija, Ukrajina i Španjolska.

Prema zadnjem godišnjem izvješću Državnog zavoda za statistiku u 2018. podaci za proizvodne površine se odnose na češnjak i ostale lukove, a taj broj iznosi 1 205 ha s ukupnom proizvodnjom od 22 831 t/ha. Međutim procjenjuje se da se sam češnjak u Hrvatskoj proizvodi na oko 300 ha uz prosječni prinos od 3 – 5 t/ha.

2.5. Biotehnološke metode na češnjaku

Primjena metoda mikropropagacije, kulture meristema, somaklonske varijabilnosti i genetičkih transformacija pomažu pri razmnožavanju, prezervaciji, oslobođenju od virusa i oplemenjivanju češnjaka (Robledo-Paz i Tovar-Soto 2012.). Početkom 20. stoljeća Haberlandt (1902.) je demonstrirao kako pojedinačne biljne stanice imaju genetski potencijal razvoja u kompletnu biljku direktno ili indirektno preko faze kalusa. Taj fenomen se naziva "totipotentnost" (Lee i sur. 2009.). U novije vrijeme termin "regeneracija" u kontekstu kulture biljnog tkiva označava razvoj cijele biljke iz stanice, tkiva ili nekog biljnog organa *in vitro*.

2.5.1. Kultura tkiva i mikropropagacija

Kultura tkiva obuhvaća *in vitro* aseptički uzgoj stanica, tkiva, organa ili cijelih biljaka u kontroliranim uvjetima (Thorpe 2007., Sidhu 2010.). Rezultat su klonovi koji su identični odabranom genotipu. U teoriji, kultura tkiva može se primijeniti na bilo koju biljku, budući da biljne stanice u svojem genomu sadržavaju sve potrebne informacije za održavanje njihovih funkcija u umjetnom mediju (Dias i sur. 2016.). Kontrolirani uvjeti omogućavaju kulturi okoliš pogodan za njihov rast i multiplikaciju te omogućuje proizvodnju biljnog materijala bez patogena. Ti uvjeti uključuju pravilnu opskrbu hranjivim tvarima, odgovarajući pH medij, odgovarajuću temperaturu, plinovito i tekuće okruženje (Husain i sur. 2012.). Tehnike kulture tkiva su posljednjih godina, osim kao alat za istraživanje, postale od velike industrijske važnosti u području razmnožavanja biljaka, uklanjanja bolesti, oplemenjivanja biljaka i proizvodnje sekundarnih metabolita (Husain i sur. 2012.). Mali komadići tkiva (koji se nazivaju eksplantati) mogu se koristiti za proizvodnju stotina i tisuća biljaka u kontinuiranom procesu. Pojedinačni eksplantat se može razmnožiti u nekoliko tisuća biljaka u relativno kratkom vremenskom razdoblju i malom prostoru, bez obzira na godišnje doba i vremenske uvjete (Akin-Idowu i sur. 2009.).

Medij za kulturu tkiva i stanica mora sadržavati sve hranjive tvari potrebne za rast i razvoj biljaka. Uglavnom se sastoji od makronutrijenata, mikronutrijenata, vitamina, drugih organskih komponenti, biljnih regulatora rasta, izvora ugljika i gelirajućih sredstava u slučaju krutog medija (Saad i Elshahed 2012.). pH medija utječe na rast biljaka i aktivnost regulatora rasta biljaka i uglavnom varira između 5,4 – 5,8. Regulatori rasta biljaka važni su u kulturi biljnog tkiva jer igraju važnu ulogu u elongaciji matičnih stanica, tropizmu i apikalnoj dominaciji. Auksini, citokinini i giberelini najčešće se koriste kao regulatori rasta biljaka (Hussain i sur. 2012.). Visoka koncentracija auksina uglavnom pogoduje stvaranju korijena, dok visoka koncentracija citokinina potiče regeneraciju izbojaka. Ravnoteža i auksina i citokinina dovodi do razvoja kalusa (Hussain i sur. 2012.). Murashige i Skoog (MS) medij (1962.) se najčešće koristi za *in vitro* razmnožavanje mnogih biljnih vrsta. Prema Saad i Elshahed (2012.) najčešći hranidbeni mediji uz MS medij su White medij, Linsmaier i Skoog (LS), Gamborg (B5) medij te Nitsch i Nitsch (NN) medij.

Biljke pokazuju širok raspon sposobnosti regeneracije unutar porodice vrsta i genotipova iste vrste. Dikotiledone obično regeneriraju lakše nego monokotiledone. Također, vegetativni dijelovi biljaka lakše se regeneriraju nego generativni (Yildiz 2012.). Eksplantati koji se koriste za *in vitro* regeneraciju trebaju biti izolirani od zdravih biljaka. Što je eksplantat stariji, manji mu je kapacitet regeneracije. Nadalje, veličina i položaj eksplantata u donorskoj biljci su važni jer eksplantati koji imaju veću količinu hranidbenih zaliha lako mogu regenerirati i biti manje ovisni o hranjivim tvarima iz medija (Yildiz 2012.). U *in vitro* uvjetima također i bakterije i gljivice imaju optimalno okruženje za rast, tako da neuspješna sterilizacija može zbog kontaminacije spriječiti regeneraciju tkiva. Površinska sterilizacija ima za cilj eliminirati sve mikroorganizme, s druge strane koncentracija, vrijeme primjene i temperatura dezinfekcijskog sredstva mogu utjecati na kapacitet regeneracije (Yildiz 2012.).

Istraživanja vezana uz primjenu mikropropagacije na češnjaku započinju 1970-ih. S ovom tehnologijom se može reproducirati veliki broj biljaka iz malih fragmenata tkiva zbog čega ima prednost nad klasičnom metodom razmnožavanja pomoću češnjeva. Mikropropagacija može biti provedena kroz 2 morfogenetska puta: pomoću organogeneze, koja rezultira formacijom organa (korijena ili stabljike) ili somatske embriogeneze kojom se formiraju strukture morfološki slične ili jednake zigotskom embriju (Robledo-Paz i Tovar-Soto 2012.). Navedeni procesi mogu se odvijati direktno ili indirektno preko kalusa. Starenjem kalusa morfogenetska sposobnost češnjaka opada i povećava se pojava abnormalnih biljaka (Novak 1990.). Iz toga razloga preferira se regeneracija koja ne uključuje prethodnu fazu kalusa. Sata i sur. (2001.) navode kako embriogeneza ima nekoliko prednosti nad organogenezom: veći potencijal za proizvodnjom velikog broja biljaka, niži zahtjevi za radnom snagom i niži troškovi. Uspostavljeno je nekoliko protokola za mikropropagaciju češnjaka koristeći oba načina morfogeneze i s različitim tipovima eksplantata, međutim više se protokola baziralo na organogenezi (Robledo-Paz i Tovar-Soto 2012.).

2.5.2. Somatska embriogeneza (SE)

Tijekom evolucije, mnoge su biljne vrste razvile različite strategije za aseksualnu embriogenezu uključujući i somatsku embriogenezu, sve kako bi zaobišle različite okolišne i genetske faktore koji sprječavaju fertilizaciju. Somatska embriogeneza pojavljuje se u ograničenoj mjeri i u prirodnim uvjetima, unutar ovula u vrsti *Paeonia* (von Arnold i sur. 2002.). Također u određenim okolišnim uvjetima kao što su visoke temperature i suša ukrasna biljka *Kalanchoë* stvara oko svojih listova male bipolarne strukture koje se kasnije razviju u biljke (Garcês i Sinha 2009.).

Somatska embriogeneza je proces regeneracije koji se sastoji od nekoliko koraka. Započinje s formacijom proembriogene mase, zatim formacijom somatskog embrija, zriobom, desikacijom te na kraju regeneracijom biljke (von Arnold i sur. 2002.). SE je rezultat fizioloških, biokemijskih i molekularnih promjena u biljnoj stanici (Méndez-Hernández i sur. 2019.). Steward i sur. (1958.) su originalno promatrali regeneraciju somatskom embriogenezom iz kulture stanica mrkve.

Pri somatskoj embriogenezi somatske stanice se razvijaju dijeljenjem da bi formirale kompletne embrije analogne zigotskim embrijima (Lee i sur. 2009.). Somatski embriji imaju bipolarnu strukturu, to jest razvijaju se sa stabljikom i korijenom, ali bez vaskularne povezanosti s roditeljskim tkivom i bez fuzije gameta (Jiménez 2001.). Tijekom svog razvoja embrij prolazi kroz različite strukturalne faze te se mogu razlikovati globularna, srcolika i torpedasta faza. Somatski embriji se mogu razviti direktno iz stanica tkiva eksplantata bez faze kalusa. Međutim indirektni put gdje su somatski embriji inducirani i razvijeni iz proliferiranog kalusa je generalno češći (Pierik 1997., Rashid 1988.).

Somatske stanice unutar biljke sadrže svu genetsku informaciju potrebnu za kreiranje kompletne funkcionalne biljke. Indukcija somatske embriogeneze mora se sastojati od trenutne terminacije ekspresije gena odgovornih za organogenezu u tkivu eksplantata i njenom zamjenom sa ekspresijom gena odgovornih za embriogenezu. Jedan od mogućih mehanizama za regulaciju ekspresije gena je DNA metilacija koja je uzrokovana auksinima (LoSchiavo i sur. 1989.). Navodi se i da stresni uvjeti kao što su niske ili visoke temperature, teški metali, osmotski šok ili suša imaju središnju ulogu u posredovanju prijenosa signala koji dovodi do reprogramiranja ekspresije gena (Nic-Can i sur. 2016., Méndez-Hernández i sur. 2019.). Osim navedenog, izvor dušika kao i njegova koncentracija u mediju je neophodan za pojavu somatske embriogeneze kod kultura kao što su mrkva, krastavac i lucerna, međutim točan mehanizam djelovanja je još uvijek nepoznat (Méndez-Hernández i sur. 2019.).

Promjene u genetskom programu stanice koje dovode do poticanja razvoja somatske embriogneneze zahtjevaju regulaciju nekoliko gena (Méndez-Hernández i sur. 2019.). U litetaturi se navode *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor Kinases), *LEC* (Leafy Cotyledon), *WUS* (*WUSCHEL*) i *BBM* (Baby Boom). Najvažniji od njih je gen *SERK* koji je prvotno bio identificiran u *Daucus carota* (Schmidt i sur. 1997.). Ovaj gen je detektiran u ranoj fazi embriogene kulture u prisutnosti 2,4 diklorofenoksioctene kiseline (2,4 D). Dokaz da *SERK* sudjeluje u indukciji SE je proizašao iz analize ekspresije gena. Na primjer, *SERK1* je jako ekspresiran tijekom formacije embriogenih stanica u *in vitro* kulturi *Arabidopsis thaliana* kao i u svim stanicama razvijajućeg embrija tijekom rane faze SE, sve do srcolike faze. Nakon srcolike faze ekspresija *SERK1* nije više detektirana u embriju. Međutim u istraživanju Hecht i sur. (2001.) kod transformiranih biljaka kod kojih je overeksprimiran *SERK1*, mRNA pokazuje 300 – 400% povećanje u efikasnosti u inicijaciji embriogeneze čak i u kasnijim fazama. Hecht i sur. (2001.) navode da ovi rezultati u povećanju razine ekspresije *SERK1* utječu na embriogenetsku sposobnost stanica u *in vitro* kulturi. *LEC* (Leafy Cotyledon) također ima važnu ulogu u regulaciji SE i razvoju embrija, a pripada skupini transkripcijskih faktora (Guo i sur. 2013.). *LEC* kontrolira različite procese kao što su morfogeneza embrija i regulacija faze zriobe. Uspostavljanje apikalnog meristema stabljike je nephodno za SE i za regeneraciju stabljike. Taj proces zahtjeva ekspresiju *WUS*-a. Važna karakteristika *WUS*-a je sposobnost kretanja iz jednog tkiva u drugo (Yadav i sur. 2011.). *WUSCHE*L i *LEC2*, reagiraju na prisutnost akusina. Jedan od ključnih regulatora biljne totipotencije je i *BBM*. *BBM* može inducirati embriogenezu u diferenciranim stanicama i može biti vitalni faktor u razvoju embriogeneze (Irikova i sur. 2012.).

Sintetski auksini poput 2,4 D su posebno učinkoviti kod proliferacije jer ih biljne stanice manje metaboliziraju nego druge auksine (von Arnold i sur. 2002.). Lee i sur. (2009.) navode da će tijekom inicijacije embriogenih kultura visoka koncentracija auksina (uobičajeno 2,4 D) potaknuti i staničnu proliferaciju (formacija kalusa) i embriogeni put razvoja. Međutim, dalje navodi kako visoke koncentracije auksina korištene prvotno za poticanje embriogeneze djeluju inhibitorno na razvoj somatskih embrija u kasnijim fazama razvoja. Abohatem i sur. (2017.) navode da se produktivnost za embriogenezu kod datulje povećala za 20 puta kada je dodana niska koncentracija 2,4 D u medij. Generalno se smatralo da se embriogeni put regeneracije determinira vrlo rano u embriogenoj kulturi, što je bio slučaj u mrkvi, koja se smatra model biljkom za somatsku embriogenezu. Jedan mehanizam, pri kojem auksin može regulirati embriogenezu je kroz zakiseljavanje citoplazme i/ili stanične stijenke. Kutschera (1994.) te Márquez-López i sur. (2018.) navode da su auksini podjednako raspoređeni u svim stanicama SE do globularne faze rasta, nakon čega dolazi do razlika u transportu i asimetrične distribucije auksina u stanice koje će formirati kotiledone i meristem korijena. U novije vrijeme, primjena nove generacije regulatora rasta kao što su oligosaharidi, jasmonati, poliamini i brasinosteroidi postaje korisna za poticanje somatske embriogeneze u mnogim biljnim vrstama (von Arnold i sur. 2002.). Stupanj diferencijacije embrija koji se odvija u prisutnosti auksina varira kod različitih vrsta. Važno je napomenuti da se auksin brzo izuzima iz medija tako da iscrpljivanje auksina u mediju za kulturu počinje već nakon nekoliko dana (von Arnold i sur. 2002.). Medij bez hormona (hormone free) se često koristi za razvoj somatskih embrija iz globularne faze u cijele biljke. Lee i sur. (2009.) navode kako je niska koncentracija hormona u mediju za razvoj katkada potrebna, ovisno o vrsti, da bi se promovirao normalan razvoj embrija.

Nizak pH je neophodan za održavanje kulture u fazi proliferacije. Između svakog perioda supkultivacije, pH medija opada s 5,8 na oko 4. Kada se kalusi mrkve (*D. carota*), koji se nalaze u predglobularnoj fazi, supkultiviraju na svjež medij bez hormona puferiran na pH 5.8, brzo nastavljaju faze razvoja (von Arnold i sur. 2002.). Embriogene kulture nekih vrsta i neki genotipovi mogu biti supkultivirani kroz produženi period na mediju koji sadrži regulatore rasta, a da i dalje zadrže puni embriogeni potencijal, to jest da i dalje imaju kapacitet za proizvodnju zrelih somatskih embrija. Međutim pojava somaklonske varijabilnosti se povećava produživanjem kulture. Većina vrsta gubi embriogeni potencijal s vremenom da bi ga na kraju potpuno izgubile.

Za indukciju somatske embriogeneze citokini nisu neophodni, međutim neke monokotiledone vrste imaju specifične zahtjeve za citokininima. Organogeneza zahtijeva 2 različita hormonalna signala za induciranje prvo stabljike, a potom korijena pri čemu se koriste 2 različita hranjiva medija. Somatska embriogeneza zahtijeva jedan hormonalni signal za poticanje razvoja bipolare strukture. Somatska embriogeneza ne zahtjeva različit medij i koriste se niže koncentracije hormona, ako i uopće da bi se promovirao razvoj embriogenih stanica u biljke (von Arnold i sur. 2002., Zimmerman 1993.). Somatska embriogeneza ima potencijal za brzu i efikasnu *in vitro* regeneraciju. Prinos i kvaliteta somatskih embrija ovise o optimizaciji sastava hranjivog medija i regulatora rasta (Lee i sur. 2009.).

2.5.3. Somatska embriogeneza na različitim kulturama

Kapacitet za somatsku embriogenezu je genetski određen. Postoje velike razlike među genotipovima za ovo svojstvo. Biljne vrste koje su sposobne eksprimirati svoj embriogeni potencijal bez obzira na tip eksplantata su npr. mrkva (*D. carota*) i lucerna (*Medicago sativa*), dok se kod mnogih drugih vrsta treba koristiti embriogeno ili jako mlado tkivo kao eksplantat (von Arnold i sur. 2002.). U literaturi se mogu pronaći različiti protokoli za somatsku embriogenezu mnogih biljnih vrsta.

Tian i sur. (2002.) su razvili protokol za regeneraciju lucerne somatskom embriogenezom. Razvili su protokol za dugoročno održavanje kulture tkiva s embriogenim potencijalom. Kalusi su prvotno bili inducirani na 2 medija, B5h i SH4K koji su sadržavali 4,5 µM 2,4 D i 0,9 µM kinetina. Embriji su se formirali 20 dana nakon inicijacije kulture, međutim samo na B5 mediju, dok na SH4K mediju nije bilo embriogeneze. Kada su kalusi prebačeni s SH4K medija na medij bez hormona, došlo je do pojave embriogeneze. Kalusi koji su se razvili na B5h mediju su brzo tijekom supkultivacije izgubili embriogeni potencijal. Kalusi razvijeni na SH4K mediju ostali su jako embriogeni. Embriji na SH4K mediju su pokazali vigor pri klijanju. Iz njih su se razvile normale i potpuno fertilne biljke (Tian i sur. 2002.).

Embriogeni kalusi *Cymbidium* orhideja potaknuti su iz longitudalno seciranih segmenta tzv. *protocorm-likebodies* (PLBs) kultivara Twilight Moon 'Day Light', hibridne orhideje na modificiranom Vacin i Went mediju, koji je sadržavao NAA (1-naftalenoctena kiselina) ili 2,4 D sam ili u kombinaciji s tidiazuronom (TDZ) kroz jedan mjesec. Huan i sur. (2004.) u svom istraživanju navode kako je optimalna kombinacija hormona za rast kalusa bila 0,1 mg L^{-1} NAA i 0,01 mg L^{-1} TDZ. Embriogene strukture su se formirale tek kada su kalusi prebačeni na medij bez regulatora rasta. Nakon 4 mjeseca embriogena masa se uspješno razvila u normalne biljke s dobro razvijenom stabljikom i korijenom nakon čega su aklimatizirane u stakleniku s postotkom preživljavanja od 100%. Nisu zamijećene morfološke varijacije između 103 regenerirane biljke stare 20 mjeseci.

Kod češnjaku srodnog vlasca (*Allium schoenoprasum* L.) je također razvijen protokol za regeneraciju pomoću SE. Zdravković-Korać i sur. (2010.) su dobili kaluse iz dijelova korijena koji su bili kultivirani na MS mediju ili Dunstan i Short mineralnoj otopini. Mediji su u svom sastavu su sadržavali 5 µM 2,4 D u kombinaciji s BAP (6-benzilaminopurin), kinetinom (KIN) ili tidiazuronom u koncentracijama od 1, 5 ili 10 µM. Najveću frekvenciju kalusa su postigli na mediju s 5 µM 2,4 D u kombinaciji s 5 µM TDZ ili 10 µM BAP (78,9% i 78,4%). Kalusi prethodno uzgajani na mediju 5 µM 2,4 D u kombinaciji s 10 µM BAP ili 10 µM TDZ su pokazali najveći postotak formacije embriogenih kalusa (45% i 42%) kao i prosječan broj somatskih embrija po kalusu. Također navode da mineralna otopina nije imala značajnog utjecaja na formaciju kalusa ili embriogenezu. Dodatak kinetina u medij (0,5, 2,5 i 5 µM) u fazi razvoja embrija kako navode, poboljšao je i ubrzao razvoj. Embrije koji su zakorijenili, presadili su u staklenik te ih je 96% preživjelo.

2.5.4. Somatska embriogeneza na češnjaku

Prva somatska embriogeneza na češnjaku je postignuta kada je 1977. Abo El-Nil primjetio formacije struktura koje je nazvao asembrioidima. Te strukture su se formirale na kalusima koji su se razvili iz vrhova stabljike, listova i baze češnjeva u prisutnosti kinetina (20 µM) i IAA (indol-3-octena kiselina) (10 µM). Optimizacija sastava medija je neophodna za osiguranje boljeg prinosa i kvalitete somatskih embrija na češnjaku (Lee i sur. 2009.). Osim toga uspješna regeneracija ovisi, kao što je prethodno navedeno o genotipu, tipu eksplantata i fiziološkom stanju te kombinaciji regulatora rasta u mediju (Hassan i sur. 2014.). U ranijim istraživanjima (Nasim i sur. 2010., Keles i sur. 2011., Khan i sur. 2004., Fereol i sur. 2002., Sata i sur. 2001., Sudarmonowati i sur. 2001.) su razvijani protokoli za somatsku embriogenezu na češnjaku optimizacijom komponenata medija i izborom tipa ekplantata. U navedenim studijama su korišteni različiti tipovi ekplantata (stabljika, list i korijen) za regeneraciju biljaka.

Haque i sur. (1998.) su koristili vrhove korijena kao eksplantat. Navode da je optimalna koncentracija 2,4 D bila 0,5 µM. Koncentracija veća od 1 µM, 2,4 D je imala inhibitorni učinak na formaciju kalusa i embrija. Embriji su proklijali i razvili korijenje na MS mediju koji je sadržavao 5,0 µM kinetina. Hassan i sur. (2014.) su u svom istraživanju također koristili vrhove korijena češnjaka kao ekplantat za stvaranje kalusa i SE s različitim kombinacijama regulatora rasta. Utvrdili su da MS koji je sadržavao 1 mg l^{-1} 2,4 D bio najprikladniji za poticanje kalusa s regeneracijom od 86,10 % i veličinom kalusa 2,19 cm u promjeru. Dalje navode da je ova koncentracija također dala embrije dobre kvalitete. Međutim navode i da je MS koji je sadržavao 2,0 mg l^{-1} kinetina dao bolje rezultate u regeneraciji biljaka iz embrija i proizveo najveći broj (4,67) i najduže (7 cm) stabljike po kalusu. Maksimalno trajanje za indukciju kalusa i embriogenezu je 17 i 10,67 dana.

Sata i sur. (2001.) razvili direktnu somatsku embriogenezu iz baze češnja. Kao eksplantat su podijelili češnjeve na 3 dijela (baza, srednji dio i vrh). Somatske embrije su dobili samo iz baze češnjeva, dok drugi dijelovi nisu pokazali potencijal za SE kultivara 'Malepur' uzgojenom na White mediju koji je sadržavao 4,5 µM 2,4 D i 2,3 µM kinetina. S tom kombinacijom je postignuta direktna somatska embriogeneza u 60% eksplantata. Pod ovim uvjetima svaki eksplantat formirao je 20 do 25 embrija, koji su se u prisutnosti visokih koncentracija kinetina pretvorili u hiperhidriranu masu tkiva. Također usporedbom White i MS medija navode da White medij ima niži sadržaj nitrata od MS. Dušik u reduciranom obliku kao što je amonijak i hidrolizirani kazein stimuliraju embriogenezu dok nitrati i glutamin inhibiraju taj proces. Narayanaswamy (1993.) navodi da su pak minimalne razine intracelularnog amonijaka iz glutamina neophodne za promociju SE.

Fereol i sur. (2002.) su proizveli somatske embrije i biljke od kulitivara 'Rouge de la Réunion' iz kalusa koje su dobili iz vrhova korijena na modificiranom B5 mediju koji je sadržavao 0,4 µM 2,4 D i kinetina 2,3 µM. 75% embriogenih kalusa je razvilo globularne embrije na tom mediju nakon 2 mjeseca. Navode kako se 30% somatskih embrija razvilo u biljke koje su uspješno aklimatizirane u stakleniku. Kasnije su Fereol i sur. (2005.) uspostavili protokol za regeneraciju embrija češnjaka kroz suspenziju stanica pri čemu su koristili mlade dijelove mladih listova uzgojenih od češnjeva kultivara 'Moraso' na B5 mediju. Embriogeni kalusi su postignuti kada su eksplantati bili uzgojeni s 4,5 µM 2,4 D i 0,47 µM kinetina, a zatim preneseni na modificirani B5 medij s 2,2 µM 2,4 D, 1,1 µM IAA, 1,1 µM NAA i 0,4 µM kinetina, plus 175 mM saharoze i 2 mM prolina. Kalusi su bili održavani na tom mediju 5 mjeseci i potom su bili korišteni za inicijaciju suspenzije stanica na modificiranom N6 mediju s 1,3 µM 2,4 D, 0,4 µM BAP i 131 mM saharoze. Produkcija embrija je bila postignuta na mediju s 2,3 µM kinetina i 0,4 µM 2,4 D. Embriji su se razvili u biljke koje su mogle proizvesti mikroglavice *in vitro*.

Khan i sur. (2004.) su razvili protokol za regeneraciju 2 kultivara češnjaka. Najviši postotak kalusa su dobili s kombinacijom 5 mg L^{-1} kinetina i 1,5 mg L^{-1} 2,4 D. Embriogene kulture su proizvele veliki broj klica na MS mediju koji je sadržavao 1 mg L^{-1} BAP. Zakorijenjivanje individualnih izdanaka je bilo postignuto nakon prebacivanja kalusa na medij bez regulatora rasta. Biljke su posađene u tlo nakon aklimatizacije.

Keles i sur. (2011.) su razvili protokol za SE turskog kulutivara češnjaka, 'Kastamonu'. Koristili su 6 tipova ekplantata (dijelove korijena, dijelove mladog lista, pravu stabljiku, dijelove baze, srednji dio i vrhove lažne stabljike). Utvrdili su značajne razlike u broju kalusa ili broju embrija po eksplantatu s obzirom na sastav medija i tip eksplantata. Somatske embrije su dobili samo iz eksplantata koji su uzeti od korijena *in vitro* proklijalih češnjeva. Najbolja formacija kalusa je dobivena na MS mediju koji je sadržavao 2 mg L^{-1} IAA, 1 mg L^{-1} 2,4 D i 2 mg L^{-1} kinetina. Nakon formacije kalusa, premješteni su na medij bez hormona. Somatska embriogeneza je postignuta iz 71,4% kalusa s prosječno 17,6 embrija po eksplantatu. Postotak klijanja embrija je iznosio 87%.

Nasim i sur. (2010.) su iz kultivara češnjaka Yamuna Safed 3 dobili kaluse iz bazalnih dijelova češnjeva na MS mediju. Embriogenezu su podijelili na 3 faze. Inicijacija i proliferacija embrija, maturacija i klijanje. Inicijaciju globularne faze su zamijetili na različitim koncentracijama BAP i 2,4 D, ali maksimalna proliferacija je postignuta na 1 mg L^{-1} BAP i 0,25 mg L^{-1} 2,4 D. Najbolji razvoj embrija je postignut kada je 0,5 mg L^{-1} GA_3 (giberelinska kiselina) bilo u mediju, dok je ABA (abscizinska kiselina) u istim količinama imala manju učinkovitost. Rast embrija je bio maksimalan pri 3% maltoze u mediju, dok konverzija embrija u biljke bila najviša (65,15%) kada je u medij dodano 3% fruktoze.

2.6. Virusi na češnjaku

Vegetativni način razmnožavanja češnjaka vodi do zaraženosti mnogim virusnim vrstama koje se iz godine u godinu akumuliraju, što rezultira u redukciji prinosa (Parrano i sur. 2012.). Stoga je proizvodnja i korištenje bezvirusnog sadnog materijala vitalna za održivu proizvodnju (Pramesh i Baranwal 2015.). Poznato je da češnjak može biti inficiran s više vrsta virusa, što se naziva još i "kompleks virusa češnjaka" (Van Dijk 1993., Gavande i sur. 2013.). Teško je izdvojiti jednu virusnu vrstu iz virusnog kompleksa češnjaka zbog sličnih karakteristika koje postoje među njima i sličnih simptoma kod prirodno zaraženih biljaka (Fajardo i sur. 2001.).

Identifikacija uzročnika ovih bolesti bila je teška i dugo vremena nepotpuna. Problemi vezani uz izolaciju i pročišćavanje virusa bili su uglavnom zbog njihovog ograničenog raspona domaćina (uključuje i nekoliko divljih vrsta *Allium*), odsutnosti specifičnih indikatorskih biljaka za njihovu diferencijaciju i istovremenih infekcija s mnogim virusima. To je dovelo do poteškoća u njihovoj identifikaciji i dezinformacija u literaturi. Među najvažnijim patogenima koji utječu na prinos češnjaka su virusi, a posebno oni koji pripadaju rodovima *Potyvirus*, *Carlavirus* i *Allexivirus* (Katis i sur. 2012., Chen i sur. 2002., Chen i sur. 2004., Chodorska i sur. 2014.).

Člankonošci igraju važnu ulogu u epidemiologiji virusa češnjaka jer se *Poty-* i *Carlavirusi* prenose putem lisnih uši na neperzistentan način, a *Allexivirusi* putem grinja. Utvrđeno je da se češnjak bez virusa brzo ponovno inficira jednom kada se posadi na polju (Lunello i sur. 2007., Melo Filho i sur. 2006.). S obzirom na to da se virusi mogu akumulirati u lukovicama, infekcija se produžuje iz prethodne sezone uzgoja u slijedeću (Walkey 1990.).

Gotovo svi izvori češnjaka sadrže viruse. Srećom, većina tih virusa u češnjaku je latentna. Latentni virusi češnjaka možda neće postati vidljivi sve dok se biljka češnjaka ne podvrgne stresu ili rastu. Najčešći simptomi infekcije virusom su promjene boje lišća. Može se pojaviti i izobličenje oblika lista. Kontrola virusnih bolesti postiže se kombinacijom sadnje zdravih češnjeva, smanjenjem populacije lisnih uši i pravilnim rasporedom zalijevanja tijekom vegetacije (De La Cruz Medina i Garcia 2007.).

Miješane virusne infekcije izazivaju simptome na lišću kao što su mozaici, klorotične pruge, pjegavost, uvijanje i zaustavljanje rasta biljke, što dovodi do stvaranja malih glavica i češnjeva reducirajući masu glavica i do 78%. Prema Melo Filho i sur. (2006.), korištenje zdravog sjemenskog materijala češnjaka može povećati prinos za više od 100%, kada se uspoređuje s standardnim sjemenom koje koriste proizvođači. Tradicionalno najveći ekonomski gubici u prinosu su uzrokovani prisutnošću *Potyvirusa*, virus žućenja i kržljavosti luka (OYDV) i u manjim razmjerima virusom žute prugavosti poriluka (LYSV) (Perotto i sur. 2010.). Drugi virusi u uglavnom latentni bez značajnog utjecaja na prinos (Van Dijk i sur. 1991.). Međutim simultana infekcija s *Carlavirus*-ima ili *Allexivirus*-ima zajedno s *Potyvirusom* može imati sinergistički učinak (negativni).

Među potyvirusim koji pogađaju *Allium* vrste virus žućenja i kržljavosti luka (OYDV) je glavni viralni patogen češnjaka i pronađen je širom svijeta (Van Dijk 1991., Lunello i sur. 2007.). OYDV je član porodice *Potyviridae*, rod *Potyvirus*. OYDV se prenosi lisnim ušima na neperzistentan način i proizvodi simptome nalik blagim klorotičnim prugama do žarko žutih pruga ovisno o izolatu virusa i kultivaru češnjaka (Gawande i sur. 2013.). Neke procjene pokazuju da ovaj virus može smanjiti prinos glavica i do 88% (Bagi i sur. 2012.).

Virus žute prugavosti poriluka je također *Potyvirus* specifičan za *Allium* vrste (Bos i sur. 1978.). *Allium Potyvirusi* rijetko prelaze na nove domaćine, što ublažava opasnost od kontaminacije i širenja na susjedne domaćine koji ne pripadaju rodu *Allium*. LYSV se može naći uobičajeno u prirodi u viralnim kompleksima s drugim virusima, kao što su OYDV i GCLV. Pojava LYSV u tim viralnim kompleksima otežava inicijalnu identifikaciju i klasifikaciju (Barg i sur. 1997.). U češnjaku LYSV uzrokuje žute pruge po listovima što može uzrokovati kržljavost cijele biljke. Ovaj virus također može utjecati na veličinu glavice deformacije što rezultira gubitkom prinosa (Sullivan i Robinson 2012.). U poriluku se infekcija pojavljuje kao ili blaga klorotična prugavost dok kod jake infekcije može doći i do bijelih pruga ili čak odumiranja cijele biljke (Paludan 1980.).

Obično latentni virus češnjaka je ograničen također na vrste roda *Allium* gdje pogađa više od 50 vrsta, sa češnjakom kao glavnim domaćinom. Također inficira poriluk i crveni luk. (Van Dijk 1993.). GCLV je latentan u češnjaku, ali u kombinacijama s *Potyvirus*-ima može dijelovati sinergistički. Postoji sumnja da se prenosi ušima, ali za to nema točnih podataka (Barg i sur. 1997., Van Dijk 1993.).

Na *Allium* vrstama prva pojava *Carlavirus*-a je ona od latentnog virusa kozjaka, a izolirana je iz *A. cepa* var. *ascalonicum* u Nizozemskoj. Latentni virus kozjaka je sveprisutan zbog vegetativne propagacije. Bos i sur. (1978.) navode kako ovaj virus može značajno reducirati prinos. U kozajku, češnjaku i crvenom luku ovaj virus se pojavljuje bez simptoma, ali također djeluje sinergistički s drugim *Potyvirus*-ima.

2.7. Oslobođenje od virusa pomoću kulture tkiva

Proizvodnja bezvirusnih biljaka češnjaka tradicionalnim agronomskim sustavima je teško izvediva i skupa jer bi se morala izvoditi u regiji u kojoj nema virusnih vektora. Da bi se prešle te prepreke razmnožavanje bezvirusnih biljaka *in vitro* može biti korišteno da se dobije velik broj biljaka bez virusa u kratkom vremenu (Moriconi i sur. 1990.). Kudělková i sur. (2016.) su radili istraživanje na eliminaciji GCLV na češnjaku pomoću kulture meristema i kemoterapije. Koristili su 5 genotipova češnjaka. Za kemoterapiju su korištene koncentracije od 25 do 50 mg L^{-1} ribavirina. Najveći broj biljaka se pokazao negativnim na virus kada je korištena koncetracija od 25 mg L^{-1} ribavirina. Na tom tretmanu GCLV je bio elimininiran u 100% biljaka genotipova 'N9A','Anton' i 'Tristan' 'D'Alsace Freres' i 'Mako'. Iako je ribavirin uspješan u eliminaciji virusa, Danci i sur. (2009.) u svom istraživanju na virusima krumpira navode kako postotak regeneracije značajno opada povećanjem koncentracije ribavirina. Razlog tomu navode njegovu fitotoksičnost i sposobnost inhibiranja ili smanjenja staničnih metaboličkih aktivnosti.

Pramesh i Baranwal (2015.) su proveli istraživanje na češnjaku, kultivar G-1. Virusi detektirani u češnjevima su uključivali OYDV, GCLV, SLV i GarV-X . Da bi dobili biljke bez virusa češnjevi G-1 su bili podvrgnuti tretmanu sa sunčevom svjetlosti na 5, 10 ili 15 dana tretmanu vrućim zrakom (na 37 ºC, 40 ºC i 42 ºC na 7, 14 i 21 dan) kombinirano s izolacijom meristema *in vitro*, a zatim su biljke testirane na viruse koristeći DAC-ELISA-u i RT-PCR. Meristemi tretirani sunčevom svjetlosti su regenerirali nakon 90 dana, a oni tretirani vrućim zrakom nakon 45 dana. Češnjak tretiran sunčevom svjetlošću 15 dana je bio slobodan od GarCLV, SLV i OYDV virusa, ali je rezultirao u regeneraciji samo 17-18%. Međutim kada je tretiran sunčevom svjetlosti 10 dana samo 66% biljaka je bilo oslobođeno svih virusa uključujući GarV-X. Tretman vrućim zrakom na 37 ºC ili 40 ºC je eliminirao GarCLV, SLV i OYDV u 20 – 38% i 42 – 62% regeneriranih biljaka. Pramesh i Baranwal (2015.) zaključuju da za većinu tretmana produženje trajanja ili jačine topline rezultira u smanjenju regeneracijske sposobnosti, ali povećava broj biljaka oslobođenih od virusa. Conci i sur. (2005.) također u svom istraživanju u kojem su koristili terapiju visokom temperaturom navode kako eksplantati koji su bili frekventno izloženi tretmanu nisu uopće regenerirali.

Somatska embriogeneza u kombinaciji s termoterapijom je također učinkovita u eliminaciji virusa. Mehanizam u kojem su regenerirani somatski embriji oslobođeni od virusa nije potpuno jasan, iako Goussard i Wiid (1992.) navode kako u pokusu s vinovom lozom nije bilo translokacije virusa u somatske embrije floemom. Razvijeni vaskularni sustav somatskih embrija nije povezan s tkivom ekplantata što daje somatskoj embriogenezi mogućnost eliminacije virusa, bilo samoj ili kombinirano s tretmanima toplinom (Bhatia i Bera 2015.). Neke od kultura na kojima je rađena somatska embriogeneza u svrhu oslobođenja od virusa uključuju kakao (Quainoo i sur. 2008.), vinovu lozu (Gambino i sur. 2006.) i kasavu (Damba i sur. 2013.). Do sada nije rađeno istraživanje na somatskoj embriogenezi češnjaka u svrhu oslobođenja od virusa.

2.8. ELISA test – serološka metoda u detekciji virusa

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je serološka tehnika ispitivanja koja se temelji na enzimatsko-serološkoj reakciji na čvrstoj fazi, a dizajnirana je tako da se detektiraju i kvantificiraju tvari kao što su peptidi, proteini, antitijela i hormoni.

Ako je ispravno korištena ELISA je osjetljiva, precizna i brza metoda. Posebno je učinkovita kada se mora ispitati veliki broj uzoraka i kada odgovarajuće indikator biljke ili staklenici nisu dostupni (Garnsey i Cambra 1991.). U ELISA-i antigen mora biti imobiliziran na čvrstoj fazi te zatim kompleksiran s antitijelom koje je vezano za enzim. Detekcija je postignuta procjenom konjugirane enzimske aktivnosti putem inkubacije sa supstratom da bi se dobio mjerljivi proizvod. Najvažniji element u procesu detekcije je visoko specifična interakcija antitijela i antigena.

Koncept ELISA-e je osnovan na tome da razni enzimi mogu biti vezani za molekule antitijela te formirati konjugirane molekule koje ujedno imaju enzimatsku i serološku aktivnost. U tu se svrhu rabe polistirenske mikrotitracijske plitice četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12x8) jažica. U testu su antigen ili protutijela označeni nekim enzimom, najčešće peroksidazom (Runje i Cvrtila 2006.). S obzirom na to da su enzimi jako aktivni i mogu biti detektirani pri niskim koncentracijama, služe kao učinkovite oznake. Enzimski obilježena antitijela mogu se detektirati kada su izložena supstratu koji enzimi mogu mijenjati. Uobičajeno je da se koristi supstrat koji mijenja boju kao rezultat enzimatske aktivnosti. Količina promijenjene boje potom može biti korištena za mjerenje prisutnosti antitijela. Enzimske oznake omogućavaju osjetljivost sličnu onoj s radioaktivnim oznakama, ali imaju nekoliko važnih prednost: stabilne su, niskih troškova, sigurne su za korištenje i mogu biti korištene bez sofisticirane opreme (Garnsey i Cambra 1991.).

"Sendvič" ELISA (double antibody sandwich, DAS-ELISA) je oblik ELISA-e koji mjeri količinu antigena između dva sloja antitijela (hvatanje i detekcija antitijela). Antigen koji se određuje mora sadržavati najmanje dva antigenska mjesta sposobna za vezanje na antitijela, jer najmanje dva antitijela djeluju u "sendviču". Specifični antigeni se vežu za antitijela, dok drugi proteini ostaju u otopini i budu uklonjeni ispiranjem. Antigen koji je vezan za antitijelo bude detektiran nakon dodavanja označenog antitijela specifičnog za taj antigen. Ta oznaka je enzim prethodno konjugiran za antitijelo. Kada je u zadnjem koraku enzim specifičan za supstrat dodan, razvije se boja kao rezultat enzimske reakcije. Garnsey i Cambra (1991.) navode kako je to najčešće korišteni oblik ELISA-e za detekciju biljnih virusa otkako je su je opisali Clark i Adams (1977.).

3. Materijali i metode

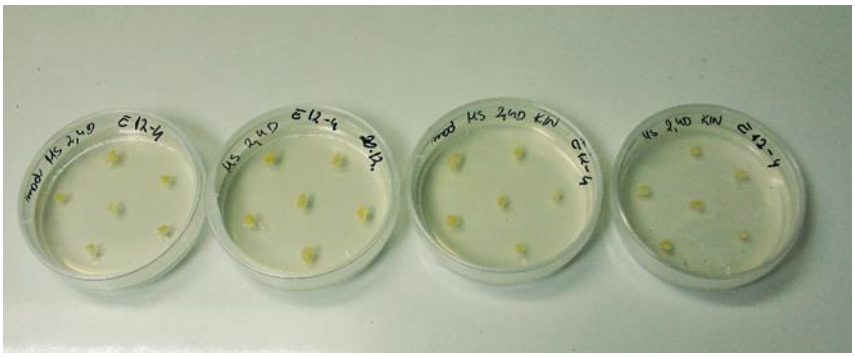
3.1. Biljni materijal

U pokusu su korištena 2 ekotipa (E12 i E13) češnjaka dobivena sa Instituta za Poljoprivredu i turizam u Poreču. Odabrano je po 8 glavica svakog ekotipa (slika 3.1.1.). Svaka glavica je razdvojena na češnjeve kojima je oguljena vanjska ljuska. Češnjevi su prvo ispirani običnom vodom 15 minuta, zatim dezinficirani 1 minutu 70%-tnim etanolom i potom s 5%-tnom otopinom Izosan G s dodatkom Tween 20, 15 minuta na tresilici. Na kraju su češnjevi ispirani 3 puta po 3 minute sterilnom destiliranom vodom. Od svake glavice su sačuvana po dva češnja da bi se posadile matične biljke koje će biti kasnije uspoređivane u ELISA testu s regeneriranima.



Slika 3.1.1. Uzorci češnjaka podijeljeni po ekotipu i glavicama (foto: K.Kurtović)

Eksplantati su bile baze češnjeva. Svakom češnju je izrezano 2 mm debljine bazalnog meristematskog dijela koji su potom izrezani na 4 jednaka segmenta (slika 3.1.2.). U Petrijeve zdjelice veličine 60 mm je stavljeno po 6 eksplantata na 4 različita hranidbena medija (tablica 3.2.1.). Eksplantati od različitih glavica postavljeni su i dalje supkultivirani odvojeno. Ukupno je bilo 48 eksplantata svakog ekotipa po tretmanu, odnosno 8 repeticija po kombinaciji tretman x ekotip.



Slika 3.1.2. Postavljanje ekplantata po tretmanima (foto: K.Kurtović)

Istovremeno uz postavljanje ekplantata, u supstrat su posađena po 2 češnja od svake lukovice za oba ekotipa za uzgoj matičnih biljaka. Biljke su uzgajane u komori rasta pri 20 °C i fotoperiodu 16/8. Pri ELISA analizi na zaraženost virusima je rađena usporedba matičnih biljaka i *in vitro* regeneriranih somatskom embriogenezom.

3.2. Priprema hranidbenog medija

Za razvoj kalusa i somatsku embriogenezu je korišten MS (Murashige i Skoog medij) medij, obični i modificirani s različitim koncentracijama 2,4 D i kinetina. Sastav hranidbenog medija te različite koncentracije regulatora rasta se nalaze u tablici 3.2.1. U čašu su prvo pipetirane potrebne količine makro i mikro elemenata, MS vitamina, izvora željeza i hormona rasta. Nakon toga su odvagani kruti sastojci, što uključuje, saharozu, inozitol i hidrolizirani kazein i dodani u čašu. Čaša sa svim sastojcima je stavljena na elektomagnetsku mješalicu kako bi se otopili kruti sastojci. Hranidbeni medij je namješten na pH 5,8 uz pomoć pH metra dodavanjem kap po kap HCl-a i/ili NaOH. Agar je nakon vaganja stavljen direktno u laboratorijsku staklenu bocu za autoklaviranje. Medij je steriliziran u autoklavu na temperaturi od 121 °C, pri tlaku od 1 bara i trajanju od 25 minuta. Nakon sterilizacije medij je izlijevan u laminaru u sterilne Petrijeve zdjelice promjera 60 mm.

Tablica 3.2.1. Sastav medija za kalusiranje i somatsku embriogenezu

Tretman	**Sastav**
MS 2,4 D	MS soli i vitamini, inozitol 0,1 g L^{-1}, saharoza 30 g L^{-1}, prolin 100 mg L^{-1}, hidrolizirani kazein 100 mg L^{-1}, 2,4 D 0,1 mg L^{-1}, Plant agar 6 g L^{-1}, pH 5,8
MS 2,4 D+KIN	MS soli i vitamini, inozitol 0,1 g L^{-1}, saharoza 30 g L^{-1}, prolin 100 mg L^{-1}, hidrolizirani kazein 100 mg L^{-1}, 2,4 D 1 mg L^{-1}, KIN 0,5 mg L^{-1}, Plant agar 6 g L^{-1}, pH 5,8
Mod MS 2,4 D	Isto kao MS 2,4 D, ali s ¼ KNO_3 i NH_4NO_3 te 2x$MgSO_4$ usporedno s punim sastavom MS
Mod MS 2,4 D+KIN	Isto kao MS 2,4 D+KIN, ali s ¼ KNO_3 i NH_4NO_3 te 2x$MgSO_4$ usporedno s punim sastavom MS

3.3. Uspostavljanje kulture

Nakon postavljanja ekplantata u medije s različitim tretmanima, kulture su inkubirane u komori rasta u mraku na 24 °C s relativnom vlagom zraka 60 – 65% 25 dana. Nakon perioda inkubacije od 25 dana zabilježene su kalogeneza i embriogeneza. Eksplantati su supkultivirani na isti medij te postavljeni u komoru sa svjetlosnim intezitetom 45 µM m^{-2} s^{-1} i fotoperiodom 16/8. Nakon 40 dana inkubacije kalusi s medija MS 2,4 D+KIN i Mod MS 2,4 D+KIN preneseni

su na MS 2,4 D medij. Biljčice razvijene iz somatskih embrija s bilo kojeg tretmana su postavljene u Magenta posudice na medij za zakorjenjivanje čiji je sastav opisan u tablici 3.3.1. Biljke dobivene od različitih glavica kultivirane su odvojeno kako bi se kasnije mogla testirati uspješnost oslobođenja od virusa u odnosu na matičnu biljku.

Tablica 3.3.1. Sastav medija za zakorijenjivanje

Tretman	**Sastav**
MS NAA+2iP	MS soli i vitamini, inozitol 0,1 g L^{-1}, saharoza 30 g L^{-1}, NAA 0,05 mg L^{-1}, 2iP 0,005 mg L^{-1}, Bacto agar 8 g L^{-1}; pH 5,8

Nakon zakorjenjivanja biljke su presađivane u supstrat u PVC kontejnere rasporeda 6x9. Supstrat je prije sađenja tretiran protiv gljivica 0,15 % otopinom Previcur Energy (Bayer). Morfološke karakteristike somatskih embrija promatrane su pod stereomikrosokopom.

3.4. ELISA test

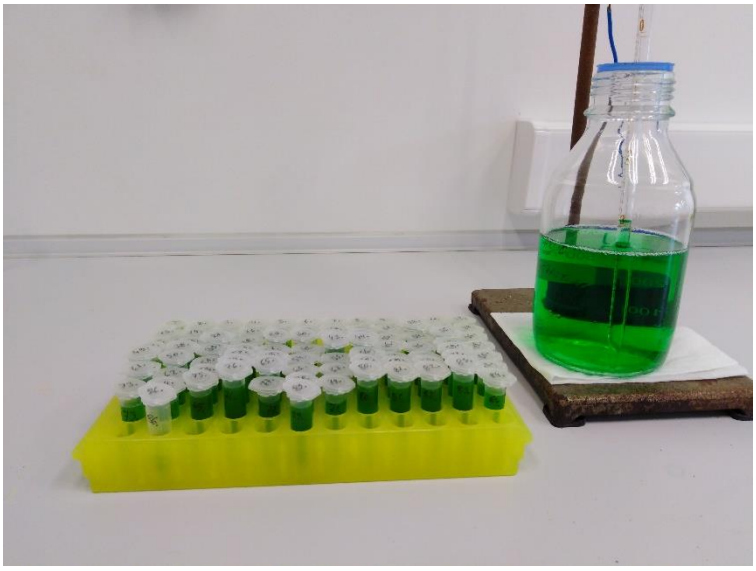
Ispitivanje zaraženosti virusima matičnih i *in vitro* regeneriranih biljaka je obuhvaćalo 4 virusa: virus žućenja i kržljavosti luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV), virus žute prugavosti poriluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV) i obično latentni virus češnjaka (*Garlic common latent virus*, GCLV) i latetni virus kozjaka (*Shallot latent virus*, SLV). U dokazivanju prisutnosti virusa korištena je metoda DAS-ELISA. Ukupno je analizirano 90 uzoraka biljaka, od kojih je 8 potjecalo od matičnih biljaka. U testiranju su korišteni komercijalni ELISA pribori tvrtke Bioreba (Švicarska) (www.bioreba.ch). Pribor za ELISA-u dostavlja se s koncentriranim puferima pripremljenim za analizu.

Kao potencijalni izvori virusa korišteni su dijelovi listova regeneriranih biljaka koje su bile posađene u supstrat (*in vivo*) i uzgajane vani pod mrežom najmanje jedan mjesec (do tri mjeseca – ovisno o vremenu regeneracije odnosno sadnje). Tkivo lista regeneriranih biljaka prikupljeno je neposredno prije analize, dok je tkivo matičnih biljaka (prethodno uzgajanih šest mjeseci) uzeto 3 tjedna ranije te zbog očuvanja držano zamrznuto. Svaki uzorak je imao oznaku kako bi se na kraju analize mogle izdvojiti potencijalne bezvirusne biljke.

Prvo se odvagne 0,1 g tkiva lista koje se zatim homogenizira s 2 mL pufera za ekstrakciju uz pomoć tekućeg dušika (slike 3.4.1 i 3.4.2). Homogenizirani uzorci se prebacuju u epruvete i centrifugiraju (slika 3.4.3.). Mikrotitarske pločice se oblažu antitijelima nakon čega se nanosi biljni ekstrakt iz uzoraka u jažice i ostavljaju na inkubaciji preko noći na 4 °C. Zatim se doda drugi sloj antitijela označenih enzimom te ponovo inkubira 5 sati na 30 °C. Zadnji korak je ispiranje s puferom i potom očitavanje rezultata spektrofotometrom. Pozitivnim su smatrani oni uzorci čija je vrijednost spektrofotometrijskog očitanja bila barem tri puta veća od prosječne vrijednosti očitanja negativnih kontrola, dok su uzorci sa spektrofotometrijskim očitanjem između dvostruke i trostruke prosječne vrijednosti očitanja negativnih kontrola smatrani kao uzorci s niskom koncentracijom virusa.



Slike 3.4.1. i 3.4.2.Vaganje i homogenizaranje uzoraka (foto: K.Kurtović)



Slika 3.4.3. Homogenizirani uzorci (foto: K.Kurtović)

3.5. Statistička analiza podataka

Analizom varijance (ANOVA) je testiran utjecaj tretmana i ekotipa na postotak kalogeneze i embriogeneze, na prosječan broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu i na uspješnost zakorjenjivanja, s razinom signifikantnosti 0,05. Duncan-ov test (Duncan Multiple Range test - DMRT) je zatim proveden da bi se uvrdilo koje se od srednjih vrijednosti međusobno značajno razlikuju. DMRT je post-hoc test koji mjeri specifične razlike između parova srednjih vrijednosti. DMRT zahtjeva veće razlike između srednjih vrijednosti od LSD (Least significance difference) testa, čime se štiti od pogreške tipa 1. Statistička analiza podataka provedena je programskim softverom SAS 9.4 (SAS 2010.).

4. Rezultati i rasprava

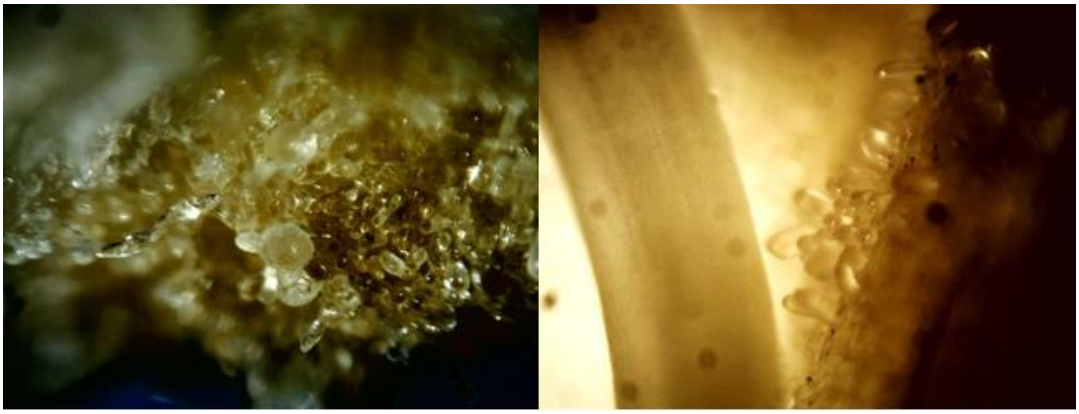
4.1. Somatska embriogeneza

Formacija kalusa i somatskih embrija promatrana je pod stereomikroskopom. Ubrzo nakon uspostave kulture se na trećini ekplantata ekotipa 12 pojavila kontaminacija, dok ekotip 13 nije bio kontaminiran. Kontaminirani eksplantati su bačeni. Kontaminacija je vjerojatno uzrokovana patogenima koji su se nalazili unutar češnjeva te nisu mogli biti uklonjeni površinskom sterilizacijom. Prva supkupltivacija je bila je izvršena nakon 25 dana. Pri tome je utvrđena pojava kalogeneze i embriogeneze, što je sukladno s rezultatima Nasim i sur. (2010.) koji su unutar 2 – 3 tjedna identificirali proembriogenu masu ili embriogene kaluse koji su brzo proliferirali, dok su Sata sur. (2012.) embriogenezu uočili nakon 5 tjedana. Kalogeneza je bila 100% prisutna na svim tipovima tretmana i na oba ekotipa (12 i 13). Kalusi su bili svijetložute boje te se oko njih stvarao mucilaginozni sekret. Prisutnost izvora akusina je kako navode Sata i sur. (2001.) generalno esencijalna za inicijaciju embrija. Embriji su se pojavljivali u nakupinama po dijelovima kalusa. Na mediju koji je sadržavao samo 2,4 D bilo obični ili modificirani je osim kalogeneze i embriogeneze došlo do razvoja korijenja koji su uklonjeni pri prvoj supkultivaciji (slika 4.1.1.).

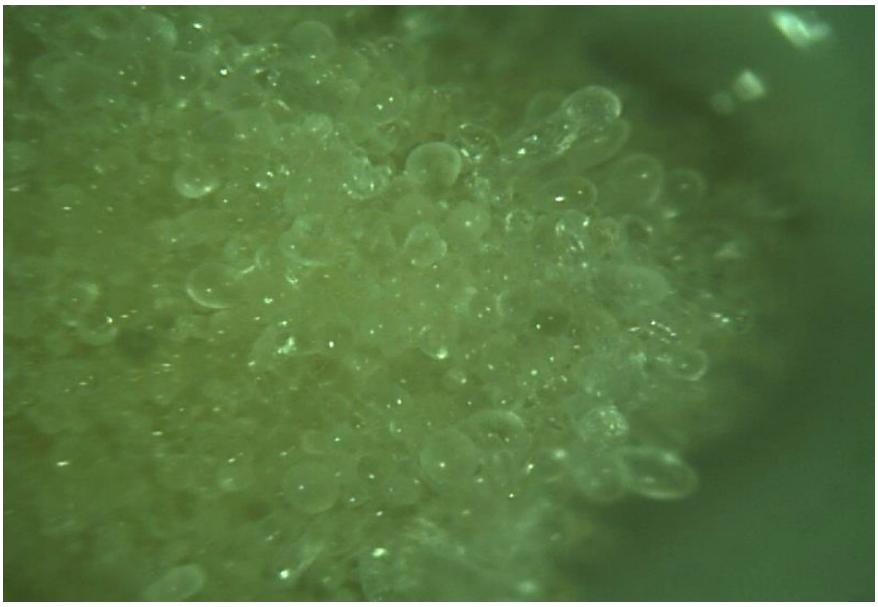


Slika 4.1.1. Razvoj korijenčića na kalusima (foto: S. Kereša)

Globularni somatski embriji su bili vidljivi direktno na eksplantatu (slika 4.1.2. a i b) ili u obliku proembriogene mase na kalusima (slika 4.1.3.).



Slika 4.1.2. Direktna somatska embriogeneza na eksplantatima (a i b) (foto: S. Kereša)

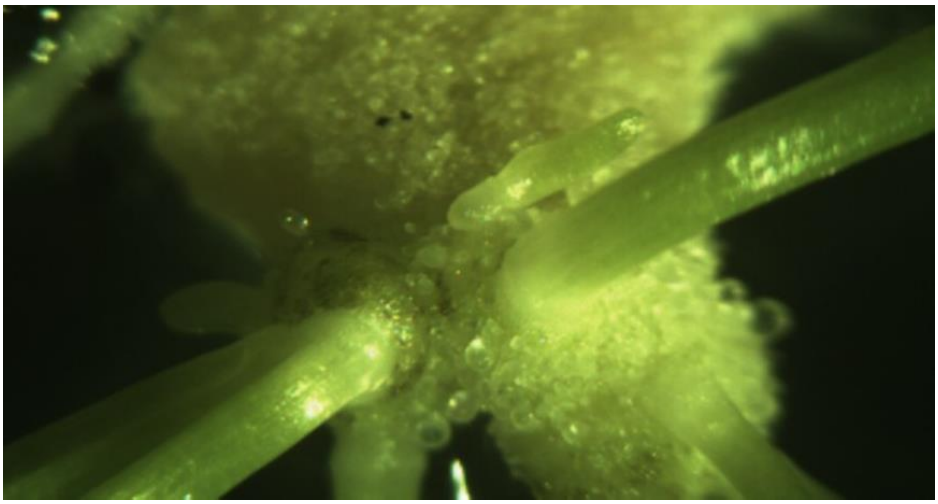


Slika 4.1.3. Nakupina globularnih somatskih embrija na kalusu (foto: S. Kereša)

Na tretmanu u kojem su bili kombinirani 1 mg L^{-1} 2,4 D+0,5 mg L^{-1} KIN su u početku stvarani veći i bolje razvijeni kalusi, no i sam 2,4 D u koncentraciji od 0,1 mg L^{-1} se pokazao učinkovitim u formaciji somatskih embrija. Slične rezultate su dobili Hassan i sur. (2014) koji navode da je najveća indukcija kalusa i najveći promjer kalusa bio na MS mediju koji je sadržavao 1 mg l^{-1} 2,4 D, dok se povećanjem koncetracije 2,4 D smanjivao postotak kalogeneze. Fereol i sur. (2012.) navode visok postotak kalusiranih ekplantata (85 i 93%) iz *in vitro* uzgojenih dijelova korijena kada je u mediju bila niska koncentracija 2,4 D (0,3 i 0,5 mg l^{-1}). Dvanaest dana nakon prve supkultivacije i stavljanja embrija na svjetlo, somatski embriji kultivirani na MS 2,4 D ili Mod MS 2,4 D su razvili izdanke bez formacije korijena (slika 4.1.4.).

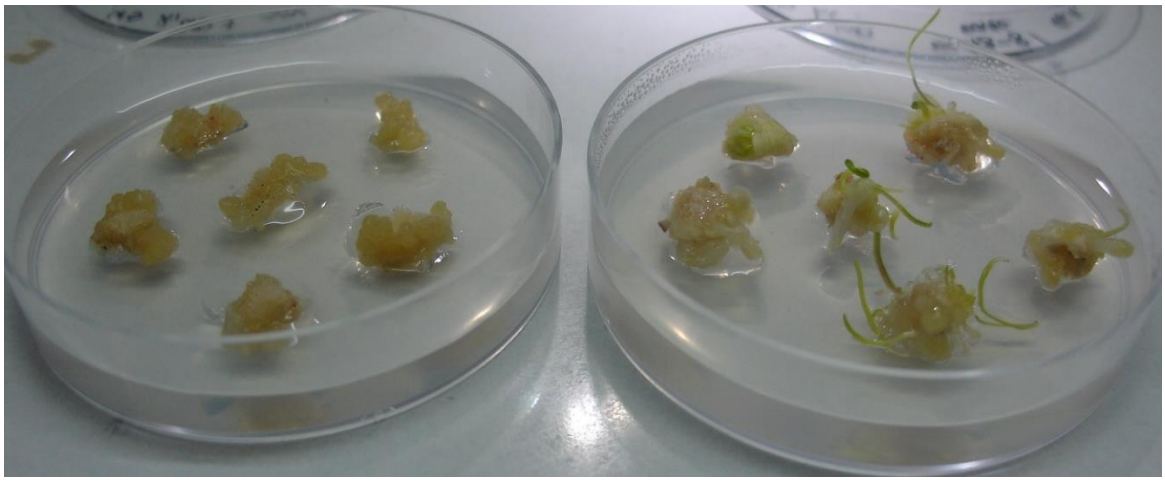
Pojava atipičnih embrija također je zailježena na riži. Abe i Futsuhara (1985.) su opazili uz razvitak normalnih embrija s izdankom i korijenom, embrije koji su sadržavali samo izdanak te navode kako su ti proembrioidi mogli biti lako odvojeni s kalusnog tkiva što je također bio slučaj na češnjaku.

Na slici 4.1.4. je prikazana nakupina embriogenog tkiva iz kojeg se razvijaju atipični embriji. Te strukture su se lako mogle odvojiti skalpelom od ostatka tkiva što ukazuje na to da se ne radi o izdancima razvijenima *de novo* organogenezom već somatskom embriogenezom.



Slika 4.1.4. Proklijali somatski embriji (foto: S. Kereša)

Iako su embriogene nakupine bile prisutne na kalusima koji su kultivirani na mediju MS 2,4 D+KIN, nije dolazilo do daljneg razvoja embrija. S obzirom na to da na kalusima kultiviranim na mediju (obični i modificirani) koji je sadržavao i kinetin SE nisu klijali, prilikom druge supkultivacije (40 dana od postavljanja pokusa) su prebačeni na medij koji je sadržavao samo nisku koncentraciju 2,4 D (MS 2,4 D). Slika 4.1.5. lijevo prikazuje kaluse na kinetinu, dok su kalusi na mediju bez kinetina, samo s 2,4 D desno.



Slika 4.1.5. Klijanje somatskih embrija na 2,4 D, ali ne i na kinetinu (foto: K.Kurtović)

Također prilikom prebacivanja kalusa koji su sadržavali kinetin u medij s 2,4 D dio embriogenih kalusa je izrezani postavljen na medij bez hormona. Na slici 4.1.6. je prikazana biljka regenerirana s dijela kalusa na mediju bez hormona. Može se uočiti kako biljka pokazuje bipolarni rast, to jest sadržava izdanak i korijen, sukladno regeneraciji somatskom embriogezom.



Slika 4.1.6. Bipolaran rast embrija s dijelova kalusa (foto: K.Kurtović)

Regenerirane biljke koje su bile kompletne ili samo one s izdankom postavljane su u Magenta posude u medij za zakorjenjivanje (NAA 0,05 mg L^{-1}, 2iP 0,005 mg L^{-1}) (slika 4.1.7.). Pri presađivanju biljaka u Magente nije rađena razlika između modificiranog i običnog medija već su te biljke išle zajedno u medij za zakorjenjivanje; razlika je rađena ovisno o tome jesu li biljke početno kultivirane na mediju samo s 2,4 D ili 2,4 D+KIN.



Slika 4.1.7. Razvoj korijena na mediju za zakorijenjivanje (foto: S. Kereša)

Regeneracijski potencijal somatskih embrija se zadržao tijekom 4 mjeseca. Nakon tog perioda regeneracija biljaka iz embrija je bila jako usporena ili je potpuno stala. von Arnold i sur. (2012.) navode kako je moguće održavati neke vrste i neke genotipove tih vrsta dug period na mediju koji sadržava regulatore rasta, a da i dalje zadrže puni embriogeni potencijal, to jest kapacitet za proizvodnju zrelih somatskih embrija. Međutim, produživanjem perioda supkultivacija se povećava pojava somaklonske varijabilnosti. Također navode da u svojim istraživanjima ne koriste embriogene kulture koje proliferiraju duže od pola godine iz prethodno navedenog razloga.

Regenerirane biljke su držane u mediju za zakorjenjivanje oko 7 tjedana prije presađivanja u supstrat. Biljke koje su razvile korijenje veličine najmanje 1 cm su presađivane u supstrat te stavljene na aklimatizaciju.

4.2. Postotak embriogeneze i broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu

Za postotak kalogeneze nije rađena statistička analiza s obzirom na to da su svi (nekontaminirani) ekplantati oba ekotipa (12, 13) kalusirali na sva 4 tretmana (MS 2,4 D, Mod MS 2,4 D, MS 2,4 D+KIN, Mod MS 2,4 D+KIN). Ovi rezultati se poklapaju s rezultatima Nasim i sur. (2010.) koji su utvrdili da je razvoj kalusa bio najveći na mediju s BAP+NAA+2,4 D, međutim individualna primjena 2,4 D je također bila učinkovita u indukciji kalusa iz baze češnja.

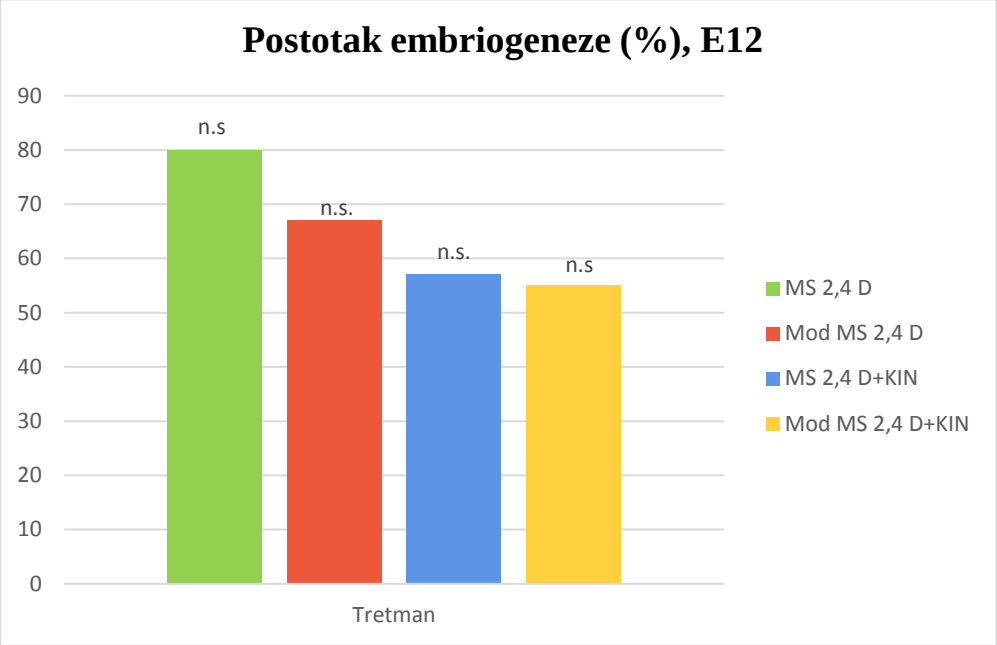
Analizom varijance je utvrđeno da kod ekotipa 12 nema signifikantne razlike u postotku embriogeneze ovisno o tretmanu. Postoji, međutim, signifikantna razlika ($P<0,05$) u broju regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu (tablica 4.2.1.).

Tablica 4.2.1. Utjecaj tretmana na postotak embriogeneze i broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu za ekotip 12

Izvor varijabilnosti	**Postotak embriogeneze %**			**Broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu**	
	DF	F Value	Pr > F	F Value	Pr > F
Tretman	3	1.22	0,3346 **n.s.**	4,08	0,0249*

*P<0,05

Rezultati na grafu 4.2.1. prikazuju postotak embriogeniih kalusa po tretmanu za ekotip 12. Postotak embriogenih kalusa na mediju MS 2,4 D je iznosio 80%, na Mod MS 2,4 D – 67 %, na MS 2,4 D+KIN – 57 %, dok je najmanje embriogenih kalusa bilo na Mod MS 2,4 D+KIN – 55 %.

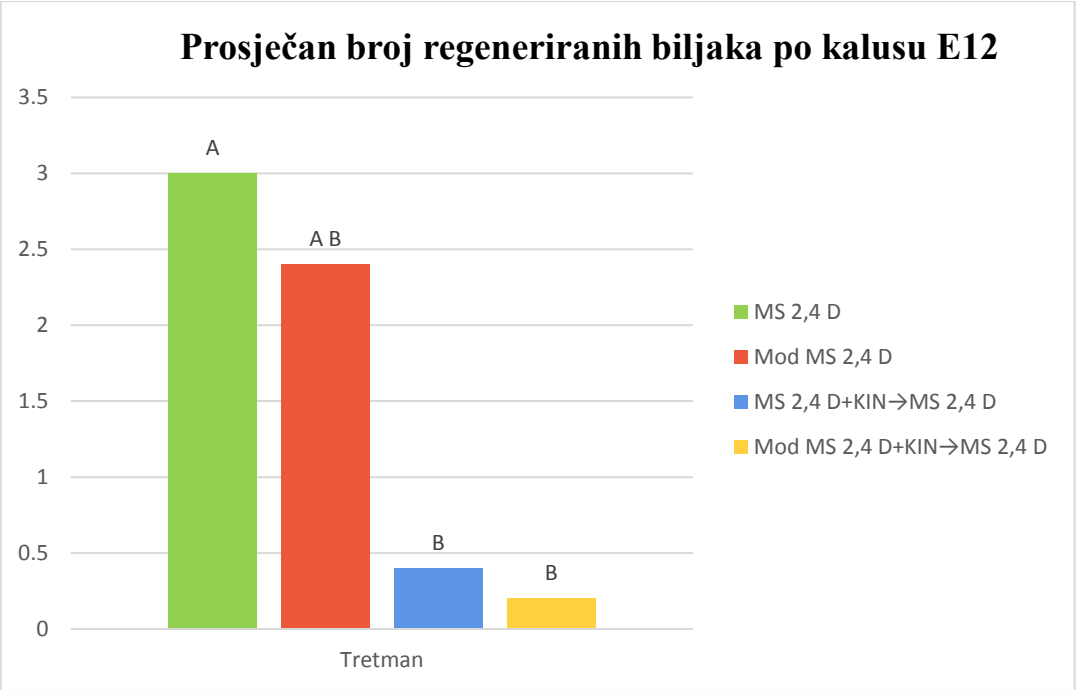


Graf 4.2.1. Postotak embriogeneze za ekotip 12 na različitim tretmanima

*Između vrijednosti nema značajne razlike (P<0,05)

Kao što je ANOVA pokazala, nema značajne razlike između tretmana u postotku embriogeneze. Ovakav rezultat je sukladan i vizualnom opažanju prilikom brojanja embriogenih kalusa. Eksplantati koji su se nalazili u mediju koji je sadržavao i kinetin, obični ili modificirani, brzo su kalusirali i počeli stvarati embrije kao i eksplantati u mediju samo s 2,4 D.

Prosječan broj regeneriranih biljaka po kalusu po tretmanima je prikazan u grafu 4.2.2. Na mediju MS 2,4 D prosječan broj biljaka je bio 3, na Mod 2,4 D 2,4, na MS 2,4 D+KIN→MS 2,4 D 0,4, dok je na Mod MS 2,4 D+KIN→MS 2,4 D bilo samo 0,2 biljke po kalusu. U prosječnom broju regeneriranih biljaka postoji značajna razlika između tretmana. Duncan-ovim testom je utvrđeno kako se broj biljaka na tretmanu MS 2,4 D značajno razlikuje od MS 2,4 D+KIN→MS 2,4 D i Mod MS 2,4 D+KIN→MS 2,4 D dok se ne razlikuje značajno od Mod MS 2,4 D.



Graf 4.2.2. Prosječan broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu za ekotip 12 po tretmanima

*Vrijednosti označene istim slovom se ne razlikuju značajno (P<0,05)

Lee i sur. (2009.) navode da visoki sadržaj 2,4 D djeluje inhibitorno na razvoj somatskih embrija u kasnijim fazama. Regeneracija biljaka na 1 mg L^{-1} 2,4 D+0,5 mg L^{-1} KIN nije bila uspješna dok kalusi nisu prebačeni na medij s niskom koncetracijom 2,4 D (označeno kao tretman MS 2,4 D+KIN→MS 2,4 D ili Mod MS 2,4 D+KIN→MS 2,4 D) što objašnjava manji broj regeneriranih biljaka s ovih tretmana. Na Mod MS 2,4 D mediju je broj regeneranih biljaka nešto niži od običnog MS medija što se može pripisati smanjenom udjelu makronutrijenata kalijevog nitrata i amonijevog nitrata, koji su potrebni za razvoj biljaka.

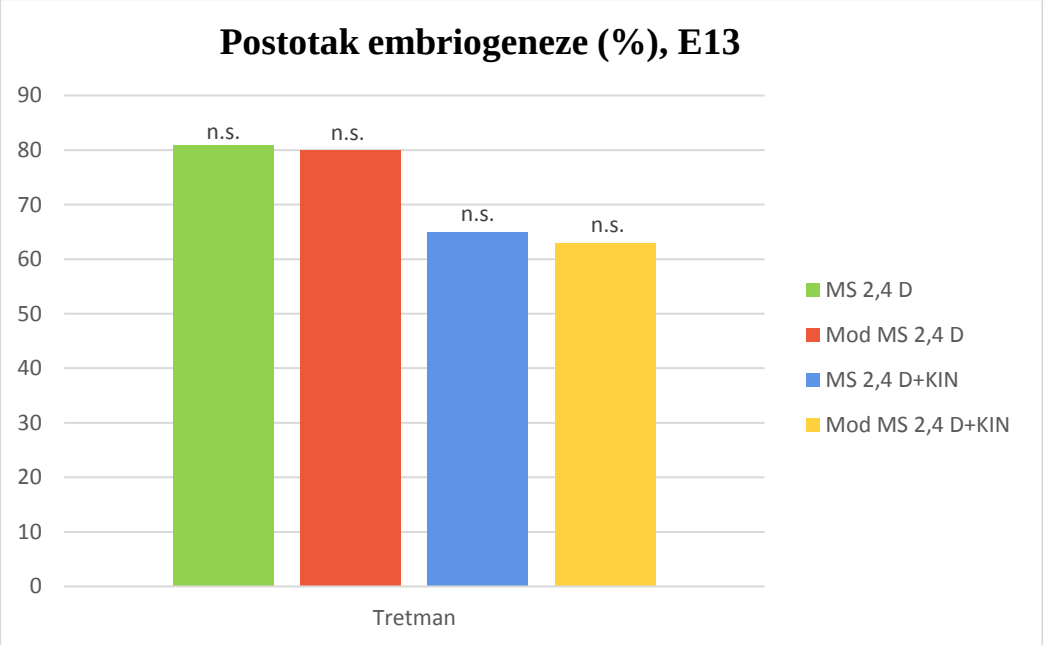
Kod ekotipa 13 također je analizom varijance utvrđeno da ovisno o tretmanu nema signifikantne razlike u postotku embriogeneze. Signifikantna razlika je utvrđena za broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu (tablica 4.2.2).

Tablica 4.2.2. Utjecaj tretmana na postotak embriogeneze i broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu za ekotip 13

Izvor varijabilnosti		**Postotak embriogeneze %**		**Broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu**	
Tretman	DF	F Value	Pr > F	F Value	Pr > F
	3	1,28	0,3004 **n.s.**	3,5	0,0284*

*P<0,05

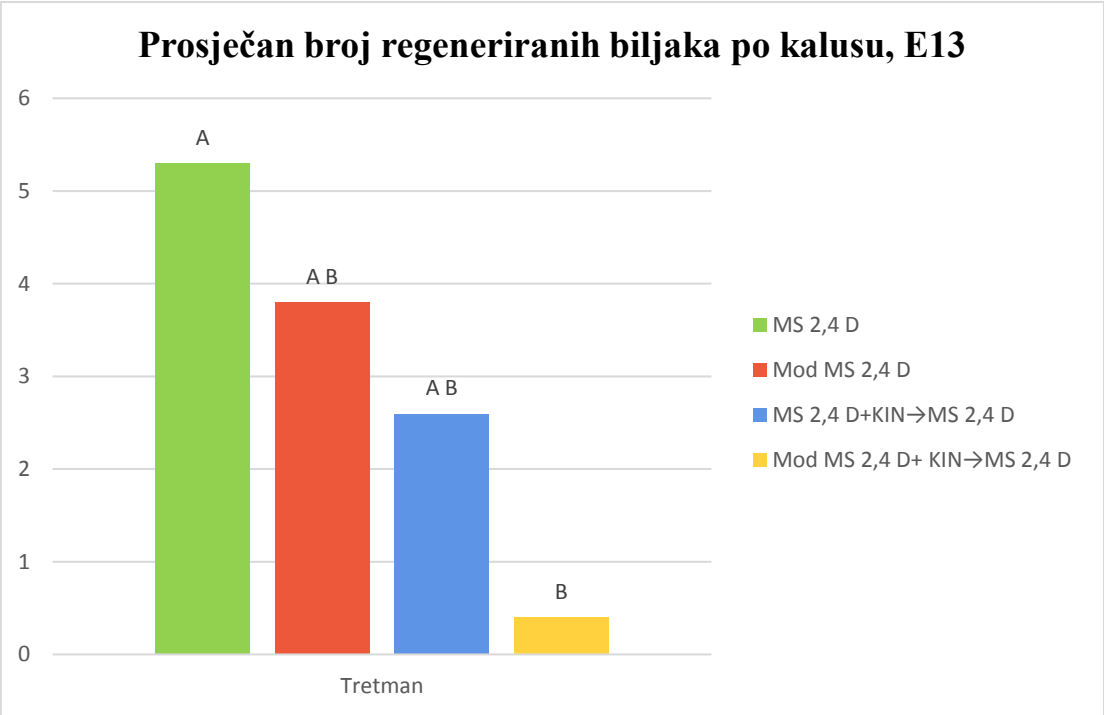
Graf 4.2.3. prikazuje postotak embriogeneze za ekotip 13 na različitim tretmanima. Postotak embriogenih kalusa na mediju MS 2,4 D iznosio je 81%, na Mod MS 2,4 D – 80%, na MS 2,4 D+KIN – 65%, dok je najmanje embriogenih kalusa bilo na Mod MS 2,4 D+KIN – 63%. Između tretmana nema značajne razlike u postotku embriogenih kalusa kao ni kod ekotipa 12. Iako nisu značajno različite, vrijednosti postotka embriogeneze bile su nešto više za ekotip 13 u odnosu na ekotip 12. Na embriogenezu utječu razlike u genetskom potencijalu, kako navodi Yildiz (2012.). Prema tome, ekotip 13 bi mogao imati i veći genetski potencijal za embriogenezu od ekotipa 12.



Graf 4.2.3. Postotak embriogeneze za ekotip 13 na različitim tretmanima

*Između vrijednosti nema značajne razlike (P<0,05)

Prosječan broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu po tretmanima za ekotip 13 prikazan je u grafu 4.2.4. Na mediju MS 2,4 D prosječan broj biljaka je bio 5,3, na Mod MS 2,4 D 3,7, na MS 2,4 D+KIN→MS 2,4 D 2,6, dok je na Mod MS 2,4 D+KIN→MS 2,4 D bilo samo 0,4 biljke po kalusu. Prema Duncan-ovom testu, u prosječnom broju regeneriranih biljaka postoji značajna razlika samo između tretmana MS 2,4 D 5,3 biljke i Mod MS 2,4 D+KIN→MS 2,4 D 0,4 biljke. Kao i kod postotka embriogeneze, prosječan broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu je na svim tretmanima veći kod ekotipa 13 nego kod ekotipa 12.



Graf 4.2.4. Prosječan broj regeneriranih biljaka po kalusu za ekotip 13 po tretmanima

*Vrijednosti označene istim slovom se ne razlikuju značajno (P<0,05)

4.3. Uspješnost zakorjenjivanja

Zakorjenjivanje biljaka provedeno je samo na jednom tretmanu (MS NAA+2iP), no uspješnost zakorjenjivanja analizirana je obzirom na prethodni medij s kojeg biljke potječu odnosno na kojem su regenerirane. Pri analizi uspješnosti zakorjenjivanja nije rađena razlika u tretmanima između običnog i modificiranog medija, već samo obzirom na sadržaj hormona (MS 2,4 D ili MS 2,4 D+KIN→2,4 D).

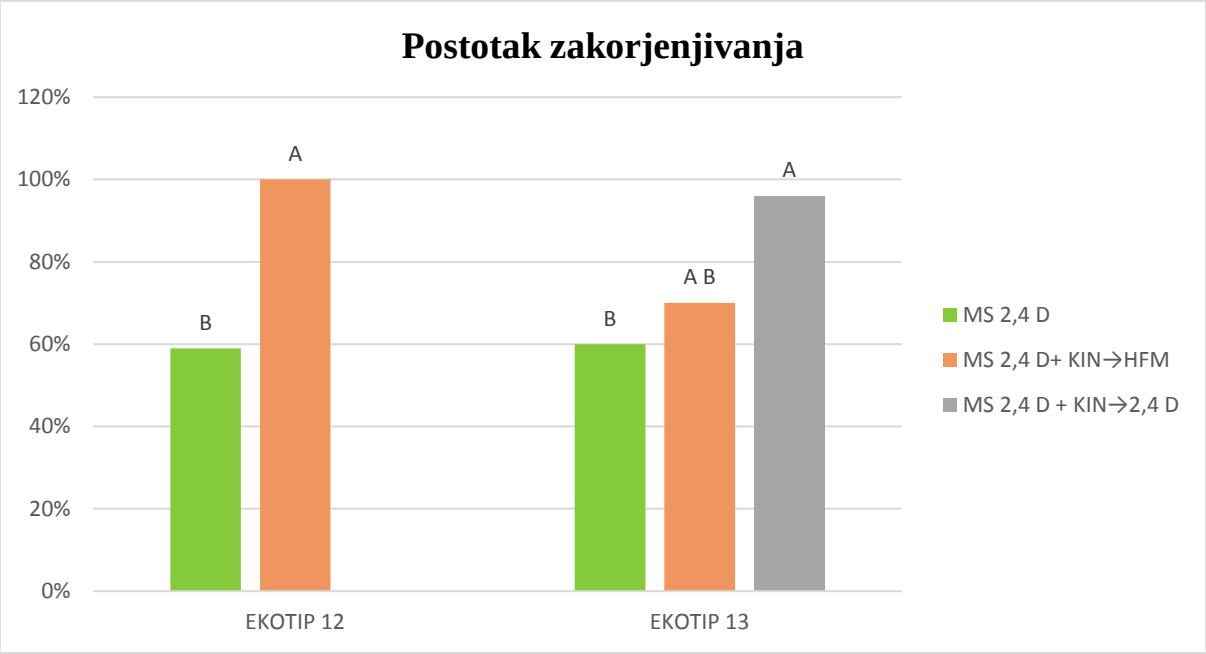
Također, kao zaseban tretman smatran je MS 2,4 D+KIN→HFM koji je korišten samo za dijelove odvojenih kalusa, a na kojem je također bilo regeneriranih biljaka (kod ekotipa 13). Tako su biljke koje potječu od istog ekotipa, glavice i tretmana (običnog ili modificiranog) presađene u iste Magente na medij za zakorjenjivanje. Analiza varijance pokazala je kako kod oba ekotipa postoje signifikantne razlike u zakorjenjivanju s obzirom na tretman (tablica 4.3.1).

Tablica 4.3.1. Utjecaj tretmana na postotak zakorijenjivanja za ekotipove 12 i 13

Izvor varijabilnosti		**Postotak zakorijenjenih biljaka E12**			**Postotak zakorijenjenih biljaka E13**	
Tretman	DF	F Value	Pr > F	DF	F Value	Pr > F
	1	7,16	0,0150 *	2	3,98	0,0242 *

*P<0,05

Postotak zakorjenjivanja obzirom na prethodni tretman za oba ekotipa je prikazana na grafu 4.3.1. Za ekotip 12 na mediju MS 2,4 D je iznosio 59%, na MS 2,4 D+KIN→HFM 100%, dok je za ekotip 13 na MS 2,4 D bilo 60% uspješno zakorijenjenih, na MS 2,4 D+KIN→HFM 70%, a na MS 2,4 D+KIN→2,4 D 96%.



Graf 4.3.1. Uspješnost zakorjenjivanja ekotipa 12 i 13.

*Vrijednosti označene istim slovom se ne razlikuju značajno (P<0,05)

Iako je više regeneriranih biljaka bilo kod ekotipa 13, uspješnost zakorijenjivanje se nije razlikovala značajno od ekotipa 12. Niska koncentracija samog 2,4 D u mediju je pogodovala većoj regeneraciji biljaka, no te biljke su su nakon presađivanja u Magente teže i sporije zakorijenjivale. Biljke ekotipa 12 koje su prvo bile na mediju s višom koncentracijom 2,4 D i kinetina, a zatim prebačene na medij bez hormona se značajno razlikuju u postotku samo između MS 2,4 D i MS 2,4+KIN→2,4 D, dok se oba navedena tretmana ne razlikuju značajno od MS 2,4 D + KIN→HFM. Statistički gledano najveće šanse za ukorjenjivanje su imale biljke s tretmana MS 2,4 D+KIN→HFM, međutim najmanji broj biljaka je regenerirao s tog tretmana.

4.4. Postotak preživjelih biljaka nakon presađivanja u supstrat

Od oba genotipa ukupno je posađeno 239 biljaka zakorijenjenih biljaka od kojih je nakon dva mjeseca uzgoja u supstratu *in vivo* preživjelo 168, odnosno 70%. Khan i sur. (2004.) također navode u svom istraživanju da je oko 75% biljaka preživjelo nakon presađivanja iz *in vitro* uvjeta u supstrat. Slika 4.4.1. prikazuje biljke presađene u supstrat. Rast *in vitro* regeneriranih biljaka je bio sporiji od matičnih biljaka te su ove biljke i nakon višemjesečnog uzgoja ostale prilično sitne.



Slika 4.4.1. Biljke presađene iz medija za zakorijenjivanje u supstrat (foto: K.Kurtović)

Tablica 4.4.1 Postotak preživjelih biljaka nakon dva mjeseca za ekotip 12 s obzirom na medij za regeneraciju

Ekotip 12	**Broj posađenih biljaka**	**Broj preživjelih biljaka**	**Postotak preživjelih**
MS 2,4 D	38	27	71%
MS 2,4 D+ KIN→HFM	4	3	75%

Kod ekotipa 12 s MS 2,4 D medija posađeno je 38 biljaka, a preživjelo ih je 71%, dok su s medija MS 2,4 D+KIN→HFM posađene samo 4 biljke od kojih su 3 preživjele, (75%) (tablica 4.4.1.).

U tablici 4.4.2. je naveden broj preživjelih biljaka po tretmanu za ekotip 13. Najviše biljaka je posađeno s medija MS 2,4 D, njih 153, ali je postotak preživljavanja (62%) nešto niži nego kod ekotipa 12. Četiri biljke su posađene s medija MS 2,4 D+KIN→2,4 D, 21 s MS 2,4 D+KIN→HFM, s postotcima preživljavanja 50 i 67%.

Tablica 4.4.2. Postotak preživjelih biljaka nakon dva mjeseca za ekotip 13 s obzirom na medij za regeneraciju

Ekotip 13	**Broj posađenih biljaka**	**Broj preživjelih biljaka**	**Postotak preživjelih**
MS 2,4 D	153	95	62%
MS 2,4 D+ KIN→2,4 D	4	2	50%
MS 2,4 D+ KIN→HFM	21	14	67%

4.5. Rezultati ELISA testa

Za ELISA analizu je bilo potrebno 0,1 g lista, stoga su birane biljke koje su dovoljno narasle kako bi nakon uzimanja uzoraka i dalje mogle rasti i razvijati se. Analizirana su 82 uzorka regeneriranih biljaka i 8 uzoraka matičnih biljaka. Popis uzoraka po ekotipu, tretmanu i glavici je naveden u tablici 4.5.1. Svaki uzorak je bio označen brojem kako bi se mogle razlikovati bezvirusne biljke od zaraženih.

Tablica 4.5.1. Popis uzoraka regeneriranih biljaka po ekotipu, glavici i tretmanu

Ekotip	**Broj glavice**	**Tretman**	**Broj analiziranih biljaka**
13	2	MS 2, 4 D	11
13	3	MS 2, 4 D	7
13	6	MS 2, 4 D	16
13	7	MS 2, 4 D	9
13	8	MS 2, 4 D	13
13	2	MS 2,4 D+ KIN→HFM	6
13	6	MS 2,4 D+ KIN→HFM	2
12	4	MS 2, 4 D	2
12	6	MS 2, 4 D	7
12	8	MS 2, 4 D	6
12	8	MS 2,4 D+ KIN→HFM	3
			Ukupno= 82

Ispitivanje zaraženosti virusima matičnih i *in vitro* regeneriranih biljaka je obuhvaćalo 4 virusa: virus žućenja i kržljavosti luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV), virus žute prugavosti poriluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV), obično latentni virus češnjaka (*Garlic common latent virus*, GCLV) i latetni virus kozjaka (*Shallot latent virus*, SLV).

U tablici 4.5.2. su navedene vrijednosti spektrofotometrijskog očitanja za matične biljke. Crvenom bojom su označeni uzorci pozitivni na pojedini virus, dok žuta boja označava uzorak s vjerojatno niskom koncentracijom virusa. Sve analizirane matične biljke bile su zaražene s minimalno 2 virusa. Sve biljke ekotipa 13 bile su zaražene virusom žućenja i kržljavosti luka (OYDV) i virusom žute prugavosti poriluka (LYSV), dok je samo 13-2 (biljka ekotipa 13 od glavice 2) imala i obično latentni virus češnjaka (GCLV). Uzorci matičnih biljaka ekotipa 12 su bili pozitivni na 3 virusa: OYDV, GCLV i LYSV. Nijedna od analiziranih biljaka nije bila pozitivna na latetni virus kozjaka (SLV).

Tablica 4.5.2. Rezultati ELISA testa matičnih biljaka

OZNAKA UZORKA	OYDV	GCLV	LYSV	SLV
13-2	1,423	2,368	0,291	0,154
13-3	2,305	0,202	1,03	0,13
13-6	1,253	0,184	0,742	0,131
13-7	0,892	0,16	0,734	0,131
13-8	1,756	0,156	0,78	0,136
12-4	1,806	1,872	0,461	0,136
12-6	1,677	1,862	0,53	0,134
12-8	2,513	1,869	1,194	0,156

Oslobođenje od virusa je postignuto na 16 regeneriranih biljaka od ukupno 82 (19,5 %). Biljke kod kojih su vrijednosti spektrofotometrijskih očitanja bile dovoljno niske da bi se proglasile oslobođenim od virusa su navedene u tablici 4.5.3.

Tablica 4.5.3. Popis biljaka kod kojih su eliminirani svi testirani virusi

Ekotip	Broj glavice	Tretman	Broj uzorka	OYDV	GCLV	LYSV	SLV
13	2	MS 2,4 D	3	0,152	0,138	0,129	0,122
13	6	MS 2,4 D	5	0,152	0,136	0,124	0,116
13	6	MS 2,4 D	6	0,163	0,167	0,157	0,129
13	6	MS 2,4 D	9	0,142	0,138	0,138	0,117
13	6	MS 2,4 D	13	0,151	0,132	0,122	0,119
13	7	MS 2,4 D	4	0,146	0,136	0,135	0,122
13	7	MS 2,4 D	7	0,145	0,147	0,164	0,133
13	7	MS 2,4 D	9	0,141	0,134	0,122	0,117
13	8	MS 2,4 D	5	0,158	0,18	0,141	0,128
13	8	MS 2,4 D	7	0,143	0,133	0,142	0,12
13	8	MS 2,4 D	12	0,165	0,13	0,121	0,12
13	2	MS 2,4 D+ KIN→ HFM	4	0,148	0,179	0,14	0,127
13	2	MS 2,4 D+ KIN→ HFM	5	0,141	0,14	0,128	0,124
13	2	MS 2,4 D+ KIN→ HFM	6	0,139	0,134	0,122	0,119
12	6	MS 2,4 D	3	0,134	0,14	0,129	0,123
12	8	MS 2,4 D	6	0,185	0,221	0,146	0,138

Kod ekotipa 12 su utvrđene samo 2 biljke bez virusa. Takav rezultat je očekivan s obzirom na to da je su za analizu većinski uzete regenerirane biljke ekotipa 13. Ekotip 13 je rezultirao s 13 biljaka oslobođenih od virusa. Tri biljke su potekle s tretmana MS 2,4 D+KIN→HFM, dok su sve ostale s MS 2,4 D. Najviše biljaka za analizu je uzeto od ekotipa 13, glavice broj 6 te je od te glavice najviše biljaka bilo bez virusa. Glavica 13-6 je imala najveći regeneracijski potencijal i prema tome najveće šanse za oslobođenje od virusa.

S obzirom na to da su analizirani ekotipovi češnjaka, a ne genotipovi, postoji mogućnost razlike u embriogenetskom potencijalu i sposobnosti regeneracije između svake pojedine glavice. Prema tome i oslobođenje od virusa bi moglo biti genetski uvjetovano.

Veći postotak biljaka bez virusa je moguće postići kombinacijom kemoterapije ili termoterapije i kulture meristema. Kudělková i sur. (2016.) su dobili oslobođenje od virusa na čak 80% biljaka pomoću kulture meristema i primjenom 25 mg L^{-1} ribavirina. Međutim zaključuju i kako koncentracije više od navedene uzrokuju deformacije i hiperhidraciju biljaka.

Oslobođenje od virusa pomoću somatske embriogeneze je postignuto kod vinove loze (Gambino i sur. 2006.) i kasave (Damba i sur. 2013.), što podržava pretpostavku od autora kao što su Chawla (2002.) te Bhatia i Bera (2015.) da se zbog nepostojanja vaskularne povezanosti somatskih embrija i kalusa (majčinskog tkiva) može dobiti biljni materijal bez virusa iako potječe od virusom zaražene biljke. Osim toga mlade stanice na kalusima brzo proliferiraju i somatski embriji koji se razvijaju iz njih mogu izbjeći napad virusa (Gambino i sur. 2006.). U ovom istraživanju, biljke regenerirane somatskom embriogenezom većinski su i dalje bile inficirane virusima. Prema Michell i sur. (1960.) kako navode Gambino i sur. (2006.) restrikcija nekih virusa na određena tkiva (virusi limitirani floemom) ne isključuje nužno druge translokacijske puteve, na primjer preko plazmodezmi, ali to je spor proces. Također početni biljni materijal od kojeg su dobiveni ekplantati je bio jako inficiran s 2 – 3 virusa što je otežavalo somatsku embriogenezu i regeneraciju.

Bezvirusne biljke su nakon analize izdvojene od virusnih i ponovno posađene s odgovarajućim oznakama te uzgajane u mrežarniku (slika 4.5.1).



Slika 4.5.1. Biljke oslobođene od virusa (foto: K.Kurtović)

4.6. Kalogeneza i embriogeneza na drugim tipovima eksplantata

Drugi tipovi ekplantata: dijelovi *in vitro* uzgojenih izdanaka i dijelovi i vrhovi *in vitro* uzgojenih korijenova se nisu pokazali uspješnima u kalogenezi i embriogenezi kao što je bio slučaj na bazama češnjeva. Nakon dva mjeseca inkubacije u mraku i na 24 °C na 4 tretmana MS 2,4 D, Mod MS 2,4 D, MS 2,4 D+KIN, Mod MS 2,4 D+KIN na nekoliko ekplantata su se počeli pojavljivati kalusi. Na dijelovima izdanaka i dijelovima korijena je uočena nakon perioda inkubacije i direktna somatska embriogeneza, međutim nije došlo do daljnjeg razvoja embrija niti regeneracije biljaka.

Fereol i sur. (2002.) su iz dijelovi *in vitro* uzgojeni mladih listova i korijena, uspjeli postići somatsku embriogenezu i regeneraciju kompletnih biljaka na B5 mediju koji je sadržavao 2,4 D (0,4 µM) i kinetin (2,3 µM). Međutim kalusi mladih listova su u njihovom istraživanju pokazali veći embriogeni potencijal nego kalusi korijenja.

Iz vrhova korijena ili dijelova korijena su također Haque i sur. (1998.), Keles i sur. (2002.) te Hassan i sur. (2014.) uspješno razvili protokole za somatsku embriogenezu. U svojim radovima zaključuju kako su razvijeni protokoli troškovno učinkoviti te da je moguće proizvesti velik broj biljaka u kratkom vremenskom periodu. Također navodi se da je sposobnost regeneracije veća iz korijena kao ekplantata od drugih tipova ekplantata, stoga bi multiplikacija novih kultivara mogla biti uspješnija.

S obzirom na to da je somatska embriogeneza i genetski uvjetovana, postoji mogućnost da bi neki drugi genotipovi ili ekotipovi uspješnije reagirali na tretmane od ekotipa 12 i 13 koji su korišteni u o istraživanju. Također kombinacijom različitih auksina i citokina u daljnjim istraživanjima bi se mogli postići uspješniji rezultati.

5. Zaključci

Češnjak je poljoprivredna i povrćarska kultura koja dobro reagira na *in vitro* uzgoj te može u kratkom vremenskom razdoblju dati velik broj regeneriranih biljaka. Najboljim tipom eksplantata pokazale su se baze češnjeva, dok drugi tipovi ekplantata (dijelovi *in vitro* izdanaka, vrhovi i dijelovi *in vitro* izraslog korijenja) nisu uspješno kalusirali niti razvili somatske embrije.

U ovom pokusu kalusiranje je bilo uspješno (100%) za oba ekotipa i na sva 4 tretmana. U postotku embriogeneze nije bilo signifikantne razlike na različitim tretmanima iako su najbolji rezultati (80% embriogenih kalusa) postignuti na mediju koji je sadržavao samo 2,4 D u niskoj koncentraciji.

Broj regeneriranih biljaka po embriogenom kalusu signifikantno se razlikovao s obzirom na tretman. Najveći broj biljaka oba ekotipa regenerirao je na MS 2,4 D mediju. Te biljke, međutim, nisu se uspješnije zakorjenjivale uspoređujući s drugim tretmanima.

Prosječna uspješnost aklimatizacije (preživljavanja) posađenih biljaka iznosila je 70%.

Rezultati ELISA testa su potvrdili pretpostavku da je moguće pomoću somatske embriogeneze postići eliminaciju virusa. Od ukupno 82 analizirane regenerirane biljke, 16 ih je bilo oslobođeno od virusa (19,5%).

U budućnosti bi se optimizacijom sastava hranidbenog medija i regulatora rasta mogao postići i veći postotak eliminacije od virusa te uspješnija kalogeneza i embriogeneza na drugim tipovima ekplantata.

6. Popis literature

1. Abe T., Futsuhara Y. (1985). Efficient Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis from Root Callus Tissues of Rice (*Oryza sativa* L.) J. PlantPhysiol. 121: 111-118
2. Abo El-Nil M.M. (1977). Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Sci. Lett. 9: 259-264
3. Abohatem M.A., Bakil Y., Baaziz M. (2017). Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of date palm. Date Palm Biotechnology Protocols. 203–214
4. Akin-Idowu P.E., Ibitoye D.O., Ademoyegun O.T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. Afr. J. Biotechnol. 8(16): 3782-3788
5. Amagase H. (2006). Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic. The Journal of Nutrition. 136(3):716–725
6. Bagi F., Stojšin V., Budakov D., El Swaeh S.M.A., Gvozdanović-Varga J. (2012). Effect of onion yellow dwarf virus (OYDV) on yield components of fall garlic (*Allium sativum* L.) in Serbia. African Journal of Agricultural Research. 7(15): 2386-2390
7. Barg E., Lesemann D.E., Vetten H.J., Green S.K. (1997). Viruses of *Alliums* and their distribution in different *Allium* crops and geographical regions. First International Symposium on Edible *Alliaceae*. J. L. Burba and C. R. Galmarini (eds.). 607-616
8. Bhagyalakshmi N., Thimmaraju R., Venkatachalam L., Chidambara Murthy K.N., Sreedhar R.V. (2005). Nutraceutical Applications of Garlic and the Intervention of Biotechnology. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 45(7-8): 607-621
9. Bhatia S., Bera T. (2015). Somatic Embryogenesis and Organogenesis. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. 209-230
10. Block E. (2010). Allium Botany and Cultivation, Ancient and Modern. U: Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science. Royal Society of Chemistry. Cambridge. 1-32.
11. Chen J., Chen J.P., Adams M.J. (2002). Characterization of some *carla*- and *poty*viruses from bulb crops in China. Archives of Virology. 147: 419–428
12. Chen J., Zheng H.Y., Antoniw J.F., Adams M.J., Chen J.P., Lin L. (2004). Detection and classification of allexiviruses from garlic in China. Archives of Virology. 149: 435–445
13. Chodorska M., Paduch-Cichal E., Kalinowska E., Szyndel M.S. (2014). Assessment Of Allexiviruses Infection In Garlic Plants In Poland. Agricultural University in Warsaw. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus. 13(2): 179-18
14. Conci V.C., Perotto M.C., Cafrune E., Lunello P. (2005). Program for Intensive Production of Virus-Free Garlic Plants. Acta horticulturae. 688:195-200
15. Damba Y., Quainoo A.K., Sowley E.N.K. (2013). Effectiveness Of Somatic Embryogenesis In Eliminating The Cassava Mosaic Virus From Infected Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) Plant Materials. International journal of scientific & technology research. 2(11): 282-287

16. Danci O., Erdei L., Vidacs L., Danci M., Baciu A., David I., Berbentea F. (2009). Influence of ribavirin on potato plants regeneration and virus. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology. 13: 421-425
17. De La Cruz Medina J., Garcia H.S. (2007). Garlic: Post-harvest Operations. Instituto Tecnologico de Veracruz. Edt by: Mejía D. AGST. [online] http://www.itver.edu.mx. - pristup 10.07.2019.
18. Dias M.I., Sousa M.J., Alves R.C., Ferreira I.C.F.R. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. Industrial Crops and Products. 82: 9-22
19. Etoh T., Simon P.W. (2002). Diversity, fertility and seed production of garlic.. In: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.), Allium Crop Science – Recent Advances. CABI Publishing. Wellingford .UK. 101-117
20. Fajardo T.V.M., Nishijima M., Buso J.A., Torres A.C., Ávila A.C., Resende R.O. (2001). Garlic viral complex: Identification of Potyviruses and Carlavirus in Central Brazil. Fitopatologia Brasileira. 26: 619-626
21. Fereol L., Chovelon V., Causse S., Michaux-Ferriere N., Kahane R. (2002). Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Rep. 21: 197–203
22. Fereol L., Chovelon V., Causse S., Triaire D., Arnault I., Auger J., Kahane R. (2005). Establishment of Embryogenic Cell Suspension Cultures of Garlic (*Allium sativum* L.), Plant Regeneration and Biochemical Analyses. Plant Cell Rep. 24: 319-325
23. Gambino G., Bondaz J., Gribaudo I. (2006). Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. European Journal of Plant Pathology. 114: 397–404
24. Garcês H.M.P., Sinha N. (2009). The 'mother of thousands' (*Kalanchoë daigremontiana*): a plant model for asexual reproduction and CAM studies. Cold Spring Harb. Protoc. 4(10): 1-9
25. Garnsey S.M., Cambra M. (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens; A handbookfor detection and diagnosis of graft-transmissible diseases of citrus. International organization of citrus virologists. FAO. 193-216
26. Gawande S.J., Chimote K.P., Gurav V.S., Gopal J. (2013). Distribution and natural incidence of Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV) on garlic and its related *Allium* species in India. Indian J. Hort. 70(4): 544-548
27. Goussard P.G., Wiid J. (1992). The elimination of fanleaf virus from grapevines using in vitro somatic embryogenesis combined with heat therapy. South African Journal of Enology and Viticulture. 13: 81–83
28. Guo F., Liu C., Xia H., Bi Y., Zhao C., Zhao,S., Hou L., Li F., Wang X. (2013). Induced expression of AtLEC1 and AtLEC2 differentially promotes somatic embryogenesis in transgenic tobacco plants. PLoS One. 8(8): 1-7
29. Hanelt P. (1990). Taxonomy, evolution and history. U: U: Onions and Allied Crops. CRC Press. Boca Raton. 1-26
30. Haque M.S., Wada T., Hattori K. (1998). Efficient plant regeneration in garlic through somatic embryogenesis from root tip explants. Plant Prod. Sci. 3: 216-222

31. Hassan M.N., Haque M.S., Hassan M.M., Haque M.S. (2014). An efficient protocol for somatic embryogenesis of garlic (*Allium sativum* L.) using root tip as explant. J. Bangladesh Agril. Univ. 12(1): 1–6
32. Hecht V., Vielle-Calzada J.P., Hartog M.V., Schmidt E.D.L., Boutilier K., Grossniklaus U., de Vries S.C. (2001). The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. Plant Physiol. 127: 803–816
33. Huan L.V.T., Takamura T., Tanaka M. (2004). Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. Plant Science 166: 1443–1449
34. Hussain A., Qarshi I.A., Nazir H., Ullah I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. in Recent Advances in Plant in vitro Culture. Edt by Annarita Leva and Laura M. R. Rinaldi. IntechOpen. 1-28
35. Ipek M., Ipek A., Simon P.W. (2008). Rapid Characterization of Garlic Clones with Locus-Specific DNA Markers. Turk. J. Agric. For. 32: 357-362
36. Irikova T., Grozeva S., Denev I. (2012). Identification of *BABY BOOM* and *LEAFY COTYLEDON* genes in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genome by their partial gene sequences. Plant Growth Regul. 67: 191–198
37. Jiménez V.M. (2001). Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 13: 196–223
38. Jones H.A., Mann L.K. (1963). Onions and Their Allies Leonard Hill Limited. London
39. Katis N.I., Maliogka V.I., Dovas C.I. (2012). Viruses of the Genus *Allium* in the Mediterranean Region. U: Advances in virus research; viruses and virus diseases of vegetables in the Mediterranean basin. London, Elsevier Inc. 163-209
40. Khan N., Alam M.S., Nath U.K. (2004). In vitro Regeneration of Garlic Through Callus Culture. Journal of Biological Sciences. 4(2): 189-191
41. Kim M.A., Park J.K. (2002). High frequency plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) calli immobilized in calcium alginate gel. Biotechnol. Bioprocess Eng. 7: 206-211
42. Kudělková M., Ondrušiková E., Sasková H. (2016). Elimination of Garlic common latent virus by meristem culture and chemotherapy. Acta Hortic. 1113. XXIX IHC – Proc. Int. Symp. on Micropropagation and In Vitro Techniques Eds.: M. Lambardi and S. Hamill. 233-238
43. Kutschera U. (1994). The current status of the acid-growth hypothesis. New Phytol. 126: 549–569
44. Lee S.Y., Kim H.H., Kim Y.K., Park II N., Park S.U. (2009). Plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) via somatic embryogenesis. Sci. Res. Essays. 4(13): 1569-1574
45. LoSchiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Veraga R., Orselli S., Terzi M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by maturation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs. Theor. App. Genet. 77(3): 325-331
46. Lunello P., Di Rienzo J., Conci V.C. (2007). Yield loss in garlic caused by Leek yellow stripe virus Argentinean isolate. Plant Disease. 91: 153–158

47. Márquez-López R.E., Pérez-Hernández, C.A., Kú-González Á., Galaz-Ávalos R.M., Loyola-Vargas V.M. (2018). Localization and transport of indole3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Protoplasma. 255: 695–708
48. Mehta J., Sharma A., Sharma N, Megwal S., Sharma G., Gehlot P., Naruka R. (2013). An improved method for callus culture and In vitro propagation of garlic (*Allium sativum* L.). Int. J. Pure App. Biosci. 1(1): 1-6
49. Melo Filho P.A., Resende R.O., Torres Cordeiro C.M., Buso J.A., Torres A.C., Dusi A.N. (2006). Viral reinfection affecting bulb production in garlic after seven years of cultivation under field conditions. Euro. J. Plant Pathol. 116: 95–101
50. Méndez-Hernández H.A, Ledezma-Rodríguez M., Avilez-Montalvo R.N., Juárez-Gómez Y.L., Skeete A., Avilez-Montalvo J., De-la-Peña C., Loyola-Vargas V.M. (2019). Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. Frontiers in Plant Science. 10(77): 1-15
51. Moriconi D.N., Conci V.C., Nome S.F. (1990). Rapid multiplication of garlic *Allium sativum* L. *in vitro*. Phyton. 51: 145–151.
52. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15: 473-497
53. Narayanaswamy S. (1993). Somatic embryogenesis in plants. U: Plant cell and tissue culture. Tata McGraw-Hill Education. New Delhi
54. Nasim S.A., Mujib A., Kapoor R., Fatima S., Mahmooduzzafar A.J. (2010). Somatic embryogenesis in *Allium sativum* L. (cv. Yamuna Safed 3): Improving embryo maturation and germination with PGRs and carbohydrates. Anales de Biología 32: 1-9
55. Nic-Can G.I., López-Torres A., Barredo-Pool F.A., Wrobel K., LoyolaVargas V.M., Rojas-Herrera R., De-la -Peña C. (2013). New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHELRELATED HOMEOBOX4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. PLoS One. 8(8):e72160. [online] https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072160 – pristup 03.07.2019.
56. Novak F.J. (1990). *Allium* Tissue Culture. U: Onions and Allied Crops. CRC Press. Boca Raton. 233-250
57. Paludan N. (1980). Virus attack on leek: survey, diagnosis, tolerance of varieties and winter hardiness. Tidsskr. Planteavl. 84:371–385
58. Parrano L., Afunian M., Pagliaccia D., Douhan G., Vidalakis G. (2012) Characterization of viruses associated with garlic plants propagated from different reproductive tissues from Italy and other geographic regions. Phytopathologia Mediterranea. 51(3): 549−565
59. Perotto M.C., Cafrune E.E., V.C. (2010) The effect of additional viral infections on garlic plants initially infected with Allexiviruses. Eur. J. Plant Pathol. 126: 489–495
60. Pierik R.L.M. (1997). Vegetative propagation. U: In Vitro Culture of Higher Plants. Springer, Dordrecht.183–230
61. Pramesh D., Baranwal V.K., (2015). Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) through meristem tip culture after solar or hot air treatment of cloves. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 90(2): 180–186

62. Quainoo A.K., Wetten A.C., Allainguillaume J. (2008). The effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the cocoa swollen shoot virus from infected cocoa trees. J. Virol. Methods. 149(1): 91-6
63. Rashid A. (1988). Cell physiology and genetics of higher plants. CRC Press. Boca Raton
64. Robledo-Paz A., Tovar-Soto H.M. (2012). Biotechnological Tools for Garlic Propagation and Improvement.U: Innovations in Biotechnology. Intech. 31-56
65. Runje M., Cvrtila Ž. (2006). Elisa u analitici hrane. Veterinarski fakultet, Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica. Meso. 7 (2): 92-95
66. Saad A.I.M., Elshahed A.M. (2012). Plant Tissue Culture Media.U: Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. IntechOpen. Rijeka. 29-41
67. Sata S.J., Bagatharia S.B., Thaker, V.S. (2001). Induction of Direct Somatic Embryogenesis in Garlic (*Allium sativum*). Meth. Cell. Sci. 22: 299-304
68. SAS/STAT (2010.) SAS Institute. Cary. NC. USA.
69. Schmidt E.D.L., Guzzo F., Toonen M.A.J., DeVries S.C. (1997). A leucine rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development 124: 2049–2062
70. Sidhu Y. (2010). In vitro micropropagation of medicinal plants by tissue culture. The Plymouth Student Scientist. 4(1): 432-449
71. Stavelikova H. (2008). Morphological characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) genetic resources collection. Information Hort. Sci. 35(3): 130–135
72. Steward F.C., Marion O.M., Mears K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am. J. Bot. 45: 705-708
73. Sudarmonowati E., Hartati N.S., Rahman N. (2001). In vitro maintenance of embriogenic callus of garlic (*Allium sativum*) and its genetic stability after 6 year maintenance. Annales Bogorienses. 7: 83-89
74. Sullivan M., Robinson, A. (2012) Pest Datasheet for Leek yellow stripe virus. Purdue University.
75. Thorpe T. (2007). History of plant tissue culture. J. Mol. Microbial Biotechnol. 37: 169-180
76. Tian L., Brown D.C.W., Watson E. (2002). Continuous long-term somatic embryogenesis in Alfalfa. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 38:279-284
77. Van Dijk P. (1993). Survey and characterization of *Potyviruses* and their strains of *Allium* species. Netherlands Journal of Plant Pathology. 99:1-48
78. Van Dijk P., Verbeek M., Bos L. (1991). Mite-borne virus isolates from cultivated Allium species and their classification into two new rymoviruses in the family Potyviridae. Netherlands Journal of Plant Pathology. 97: 381-399
79. von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69: 233-249
80. Walkey D.G.A. (1990). Virus diseases. U: Onion and allied crops (H.D. Rabinowitch and J.L. Brewster, eds.). CRC Press. Boca Raton. 191–212.
81. White K., Zellner J. (2008). Garlic. U: College Seminar 235 Food for Thought: The Science, Culture, & Politics of Food Spring.

82. Yadav R. K., Perales M., Gruel J., Girke T., Jonsson H., Reddy G.V. (2011). *WUSCHEL* protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. Genes. Dev. 25:2025–2030
83. Yildiz M. (2012). The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. Recent Advances in Plant in vitro Culture. IntechOpen. 41-63
84. Zdravković-Korać S., Milojević J., Tubić L., Alić-Dragosavac D.C., Mitić N., Vinterhalter B. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration from root sections of *Allium schoenoprasum* L. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 101: 237–244

WEB izvori

1. Biljna proizvodnja u 2018., Državni zavod za statistiku DZS, https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2019/01-01-14_01_2019.htm – pristup 20.06.2019.
2. BIOREBA http://www.bioreba.ch/saas/web/bioreba/ – pristup 05.07.2019.
3. FAOSTAT http://www.fao.org/home/en – pristup 21.06.2019.
4. Gospodarski list https://gospodarski.hr/ – pristup 01.07.2019.
5. Overview of ELISA,Thermo Fisher https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html – pristup 10.07.2019.

Životopis

Katarina Kurtović rođena je u Sisku 5. studenog 1995. godine. Upisala je srednju školu Viktorovac 2010. godine, smjer farmaceutski tehničar. Završila je 2014. godine, nakon čega upisuje preddiplomski studij Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.

Preddiplomski studij je završila 2017. godine obranom završnog rada pod nazivom "Promjene u kemijskom sastavu i reološkim svojstvima pšenice tijekom skladištenja". Iste godine upisuje diplomski studij, također smjer Biljne znanosti.

U okviru ERASMUS+ programa 2018. godine boravi ljetni semestar na razmjeni na Sveučilištu Hohenheim u Stuttgartu. U sklopu CEEPUS programa 2019. sudjeluje 2 mjeseca na praksi na Zavodu za biotehnoogiju, odjel za pivarstvo na Sveučilištu kemije i tehnologije u Pragu.