Mikropropagacija i mikrotuberizacija tradicijskog kultivara krumpira 'Brinjak'

Kovač, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:311640

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

MIKROPROPAGACIJA I MIKROTUBERIZACIJA TRADICIJSKOG KULTIVARA KRUMPIRA 'Brinjak'

DIPLOMSKI RAD

Ana Kovač

Zagreb, rujan, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Biljne znanosti

MIKROPROPAGACIJA I MIRKOTUBERIZACIJA TRADICIJSKOG KULTIVARA KRUMPIRA 'Brinjak'

DIPLOMSKI RAD

Ana Kovač

Mentor:

prof. dr. sc. Snježana Kereša

Zagreb, rujan, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ana Kovač**, JMBAG 0012254672, rođena 25. 07. 1993. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

MIKROPROPAGACIJA I MIKROTUBERIZACIJA TRADICIJSKOG KULTIVARA KRUMPIRA

'Brinjak'

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

_____
Potpis studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Ane Kovač**, JMBAG 0012254672, naslova

MIKROPROPAGACIJA I MIKROTUBERIZACIJA TRADICIJSKOG KULTIVARA KRUMPIRA 'Brinjak'

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	prof. dr. sc. Snježana Kereša	mentor	_____
2.	prof. dr. sc. Milan Pospišil	član	_____
3.	doc. dr. sc. Ivanka Habuš Jerčić	član	_____

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Snježani Kereša na trudu, volji i želji. Predugo je trajao ovaj proces pisanja diplomskog i kada bih klonula, Vi kao da ste znali kada treba poslati poruku da me podsjetite na nešto i tako me trgnete. Hvala Vam!

Sadržaj

1. UVOD 1
   1.1. Cilj rada 2
2. PREGLED LITERATURE 3
   2.1. Podrijetlo i klasifikacija 3
   2.2. Hranidbena i zdravstvena vrijednost krumpira 4
   2.3. Tehnologija proizvodnje krumpira 4
      2.3.1 Plodored 4
      2.3.2 Obrada tla 5
      2.3.3 Gnojidba 5
      2.3.4 Sadnja 6
   2.4. Suvremena proizvodnja krumpira 6
   2.5. Bolesti na krumpiru 7
      2.5.1 Virusne bolesti krumpira 7
   2.6. Biotehnološke metode na krumpiru 10
      2.6.1 Mikropropagacija 11
      2.6.2 Mikortuberizacija 11
3. MATERIJAL I METODE 13
   3.1. Biljni materijal 13
   3.2. Metode 13
      3.2.1 Uspostava *in vitro* kulture 13
      3.2.2 Postavljanje pokusa mikropropagacije 13
      3.2.3 Postavljanje pokusa mikrotuberizacije 14
   3.3. Statistička obrada podataka 15
4. REZULTATI I RASPRAVA 16
   4.1. Mikropropagacija 16
   4.2. Dužina korijena i postotak zakorijenjivanja 20
   4.3. Mikrotuberizacija 21
      4.3.1 Postotak izdanaka s mikrogomoljima i broj mikrogomolja po izdanku 22
      4.3.2 Promjer i masa mikrogomolja 24
5. ZAKLJUČAK 27
6. POPIS LITERATURE 28
7. POPIS SLIKA 30

8. POPIS TABLICA 30
9. POPIS GRAFOVA 30
Životopis 31

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ane Kovač**, naslova

MIKROPROPAGACIJA I MIRKOTUBERIZACIJA TRADICIJSKOG KULTIVARA KRUMPIRA 'Brinjak'

Krumpir je vrsta koja može biti inficirana različitim virusima što smanjuje prinos i kvalitetu gomolja. Mikro tehnike razmnožavanja krumpira se koriste za proizvodnju zdravih biljaka. Krumpir se može *in vitro* razmnožavati mikropropagacijom koja rezultira proizvodnjom zakorijenjenih biljaka koje se zatim sade u staklenik radi proizvodnje zdravih minigomolja ili mikrotuberizacijom kojom se proizvode mali mikrogomolji u *in vitro* uvjetima. Takvi se mikrogomolji također mogu koristiti za daljnju proizvodnju minigomolja u zaštićenom prostoru. Cilj ovog rada bio je stoga kod tradicijskog kultivara krumpira 'Brinjak' ispitati uspješnost mikropropagacije uz dodatak različitih regulatora rasta u medij i uspješnost mikrotuberizacije pri različitim tretmanima. Za mikropropagaciju je korišten Murashige i Skoog medij s dodatkom 3% saharoze, a za mikrotuberizaciju isti medij s 8% saharoze. Obzirom na kvalitetu izdanaka, najbolju razvijenost korijena i postotak zakorijenjivanja, biljke mikropropagirane u mediju bez regulatora rasta (HFM-Mt) i mediju s dodatkom 2,5 mg/l GA3 postigle bi najbolju stopu preživljavanja nakon prijenosa u *in vitro* uvjete. Tretman s 2,5 mg/l GA3 + 0,5 mg/l BAP-a se zbog loše kvalitete izdanaka ne preporuča u mikropropagaciji tradicijskog kultivira 'Brinjak'. Kod mikrotuberizacije veći postotak izdanaka s formiranim mikrogomoljima dobiven je u tretmanu s 4 mg/l kinetina i 1 mg/l 6-benzilaminopurina (KIN4 BAP1) u odnosu na tretman bez regulatora rasta (HFM-Mt). Također, mrak je povoljno utjecao na veći postotak izdanaka s formiranim mikrogomoljima. Promjer mikrogomolja i masa mikrogomolja bili su značajno veći kod tretmana KIN4 BAP1 na kratkom danu.

Ključne riječi: krumpir, mikropropagacija, mikrotuberizacija, biljni regulatori rasta, fotoperiod

Summary

Of the master's thesis - student **Ana Kovač,** entitled

MICROPROPAGARION AND MICROTUBERIZATION OF THE TRADITIONAL POTATO CULTIVAR „BRINJAK“

Potatoe is a species that can be infected with various viruses which reduces the yield and quality of tubers. Micro techniques for potato propagation are used to produce healthy plants. Potatoes can be propagated *in vitro* by micropropagation resulting in the production of rooted plants which are then planted in a greenhouse due to production of healthy mini-tubers; or by microtuberization which produces small microtubers *in vitro*. Such microtubers can also be used for further production of mini-tubers in a protected area. The aim of this study was therefore to examine the success of micropropagation with the addition of different growth regulators in the medium and the success of microtuberization in different treatments in the traditional potato cultivar 'Brinjak'. Murashige and Skoog medium with the addition of 3% sucrose were used for micropropagation, and the same medium with 8% sucrose was used for microtuberization. Given the quality of the shoots, best root development, and rooting rate, plants micropropagated in medium without growth regulator (HFM-Mt) and medium supplemented with 2.5 mg /l GA3 were likely to achieve the best survival rate after *in vitro* conditions. Treatment with 2.5 mg /l GA3 + 0.5 mg /l BAP is not recommended for the micropropagation of the traditional cultivar 'Brinjak'due to poor shoot quality. In microtuberization, a higher percentage of shoots with formed microtubers was obtained in the treatment with 4 mg /l kinetin and 1 mg /l 6-benzylaminopurine (KIN4 BAP1) compared to the treatment without growth regulator (HFM-Mt). Also, darkness favorably affected a higher percentage of shoots with formed microtubers. The diameter of the microtubers and the weight of the microtubers were significantly higher in the KIN4 BAP1 treatment on a short day.

Keywords: potato, micropropagation, microtuberizatio, plant growth regularors, photoperiod

1. UVOD

Krumpir (lat. *Solanum tuberosum*) je biljka iz porodice pomoćnica (*Solonaceae*). Rod *Solanum* obuhvaća preko 1000 vrsta, od kojih oko 200 razvijaju gomolje. Obični krumpir, *Solanum tuberosum* L., je tetraploidan (2n = 48). Biljka krumpira sastoji se od stabljike sa neparno složenim listovima, cvjetova i plodova sa sjemenkama (cima), stolona (podzemna stabljika), gomolja i korijena. Plod krumpira je višesjemena boba, zelene bolje. (Pospišil, 2010).

Krumpir je uz kukuruz, pšenicu i rižu jedna od najvažnijih ratarskih kultura u proizvodnji hrane. Najvažniji dio biljke je gomolj koji je odličan izvor ugljikohidrata (najviše škroba), esencijalnih kiselina, posebno licina, ne sadrži sol niti kolesterol (Saker i sur., 2012). Prema Državnom zavodu za statistiku (DZS), u 2019. godini uspoređujući je s 2018. godinom, površine pod korjenastim i gomoljastim usjevima bilježe smanjenje od 2120 hektara (ha). Pod korjenaste i gomoljaste usjeve spadaju krumpir, šećerna repa i krmno korjenasto bilje, odnosno stočna repa, stočni kelj te ostalo korjenasto krmo bilje. Međutim, žetvena površina pod krumpirom u 2018. godini iznosila je 9272 ha, a u 2019. godini 9387 ha što je više za 115 ha. Iako je žetvena površina bila veća, proizvodnja i prinos bili su veći u 2018. godini u odnosnu na 2019. godinu. Proizvodnja u 2018. godini iznosila je 182261 tonu (t), a u 2019. godini 173149 t. Prinos po ha je u 2018. godini iznosio 19,7 tona, a u 2019. godini 18,4 tone (https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2020/SI-1655.pdf). Pet najvećih svjetskih proizvođača krumpira su Kina s proizvodnjom od 74 milijardi tona krumpira, druga po redu je Indija s 36 milijardi tona krumpira te ju slijede Sjedinjene Američke Države (SAD), Njemačka i Rusija (https://www.poslovni.hr/svijet/kina-najveci-svjetski-proizvoac-krumpira-2-223262).

Europska unija je odredila Irsku kao zaštićeno područje na kojem se uzgaja sjemenski krumpir. U zaštićenim regijama može biti plasirano samo osnovno i predosnovno sjeme krumpira jer je cilj da se poljoprivrednici opskrbe visokokvalitetnim sjemenskim krumpirom (McMonagle i sur., 2020). Prema Hossain i sur. (2017) ključni problemi tradicijskog uzgajanja sjemenskog gomolja su niska stopa rasta krumpira i osjetljivost na virusne, gljivične i/ili bakterijske bolesti koje se povećavaju umnažanjem. U RH se mogu proizvoditi sve sorte koje su upisane na sortnu listu Ministarstva poljoprivrede, dok se introducirane i domaće sorte moraju prethodno ispitati pomoću službenih sortnih pokusa što ih prati državna sortna komisija (Jurišić, 2016). Površine pod sjemenskim krumpirom u Hrvatskoj se iz godine u godinu smanjuju iako za njegov uzgoj postoje uvjeti. U Republici Hrvatskoj 2019. godine pet proizvođača sjemenskog krumpira (Agrovelebit d.o.o., Obrt Agro Žumberak, OPG Zolika Račman, Sjemenarska zadruga Graminea i Stolona j.d.o.o.) posadilo je 23 sorte sjemenskog krumpira na 31 ha, što je najmanja proizvodnja do sada (oko 300 tona). Prosječan prinos sjemenskog krumpira u Hrvatskoj kreće se od 10 - 20 t/ha, a u EU oko 30 t/ha (Pospišil., i sur., 2019). Glavni razlozi smanjenja proizvodnje sjemenskog krumpira u Hrvatskoj su uvoz iz država EU i rizik u proizvodnji. Proizvođači u Hrvatskoj imaju probleme kao što su: velika usitnjenost i dislociranost parcela te skupa proizvodnja sjemenskog krumpira (8000 - 10000 eura/ha) pa teško mogu biti konkurentni stranim dobro organiziranim sjemenskim kućama, a trebaju zadovoljiti niz zakona i pravilnika. Za opstanak domaće proizvodnje sjemenskog krumpira nije

dovoljno imati samo povoljne ekološke uvjete kao što imaju Gorski kotar, Lika, Žumberak i tradiciju u proizvodnji, već primjenjivati najsuvremeniju tehnologiju i znanje u proizvodnji, doradi i skladištenju. Kako bi pospješili domaću proizvodnju sjemenskog krumpira treba osigurati ostanak mladih obrazovanih ljudi na tim područjima te utjecati na isplativost proizvodnje. Trenutna politička potpora omogućava da se poljoprivrednicima u uzgojnom području za sjemenski krumpir bolje isplati imati neobrađenu zemlju nego uzgajati ga. Zbog visokih primanja bez rada poljoprivrednici ne žele prepustiti zemlju na obradu nekome tko bi proizvodio. Također, državnim mjerama potrebno je stvoriti okvir koji će omogućiti ozbiljnije investiranje u proizvodnju sjemenskog krumpira i značajno povećati površine. U tom smislu proizvodnju sjemenskog krumpira trebalo bi svrstati u prioritetni sektor. Održivost i konkurentnost na tržištu EU može se postići samo povećanjem proizvodnih površina i prinosa krumpira te boljom organiziranošću proizvodnje. U okviru Nacionalnog program očuvanja i održive uporabe biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu u Republici Hrvatskoj, na Agronomskom fakultetu u Zagrebu se od 2017. godine održava nekoliko starih sorata krumpira pogodnih za uzgoj “on farm”, koje mogu imati lokalni značaj (Pospišil i sur., 2019).

1.1. Cilj rada

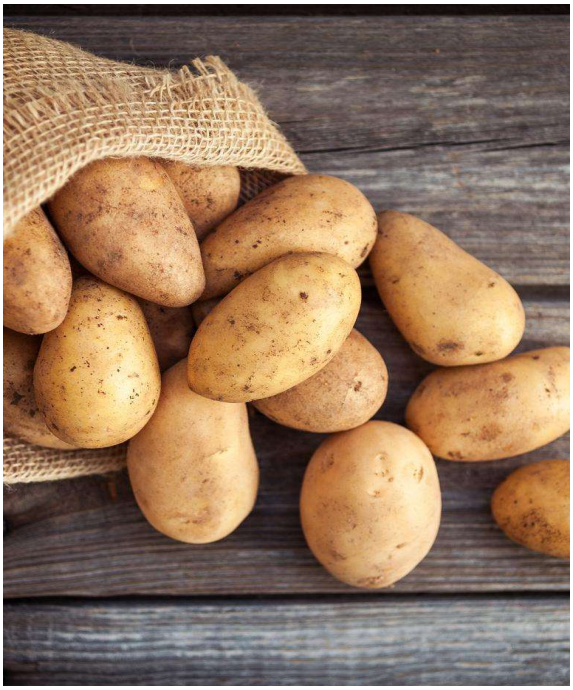
Cilj ovog rada je kod tradicijskog kultivara krumpira 'Brinjak' ispitati uspješnost mikropropagacije uz dodatak različitih regulatora rasta u medij i uspješnost mikrotuberizacije pri različitim tretmanima.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Podrijetlo i klasifikacija

Krumpir *Solanum tuberosum* L. je zeljasta višegodišnja biljka. Švicarski botaničar Kaspar Bauhin prvi spominje krumpir u Europi (1596. godine) pod imenom *Solanum tuberosum esclentum*. Linneaus uvođenjem binarne nomenklature, 1753. godine imenuje krumpir *Solanum tuberosum* L.. Različite divlje vrste su rasprostranjene na jugu Sjeverne Amerike, u Meksiku, Centralnoj Americi i po cijeloj Južnoj Americi. Krumpir potječe iz peruanskih Anda (Peru, Bolivija) gdje je Inkama, uz kukuruz, bio glavna hrana. U Andama, područje Perua i Bolivije, dvije vrste krumpira rastu samoniklo na visinama od 1200 do 1800 metara (m). Krumpir je uzgajan prije više od 8000 godina na jugu istočnog Perua.

Krumpir koji se danas uzgaja u Europi (slika 2.1.1.) najviše sliči primitivnim sortama *S. tuberosum subsp*. *tuberosum* kakav se uzgaja u Čileu. U 16. stoljeću španjolski istraživači su unijeli krumpir u Europu. U 18. stoljeću krumpir je poprilično raširen i u Hrvatskoj, a donijeli su ga graničarski vojnici 1779. i 1780. godine. U prvoj polovici 18. stoljeća, krumpir je postao neizostavna hrana u Europi, a naročito u Irskoj gdje su se stanovnici hranili isključivo krumpirom i mlijekom. U Europu je 1840. godine prodrla plamenjača. U Irskoj se plamenjača širila epidemijski te je od 1845. godine do 1847. godine krumpir propao i uzgoj više nije bio moguć. Umrlo je oko milijun ljudi te se isto toliko ljudi iselilo (Lešić i sur., 2004.).



Slika 2.1.1. Krumpir

Izvor:

https://www.google.com/search?q=krumpir&sxsrf=ALeKk03BMWYukhW3l4jV1OV1lyClcDQBig:1629720062117&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjXtYqrjMfyAhXLxYUKHZxJDZwQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1366&bih=657#imgrc=bf7ymmF1qHpXaM - pristup: 23.08.2021.

2.2. Hranidbena i zdravstvena vrijednost krumpira

Krumpir, ovisno o navikama i udjelu u ishrani, različito pridonosi u osiguranju dnevnih potreba za kalorijama, ugljikohidratima, proteinima i vitaminima. Jestivi dio gomolja krumpira sadrži oko 25% suhe tvari, ali je taj postotak različit, ovisno o kultivarima. Kultivari s visokim sadržajem suhe tvari gomolja imaju više od 25% suhe tvari, sa srednjim sadržajem oko 22-25% te s niskim sadržajem suhe tvari sadrže manje od 22% suhe tvari. Većinu suhe tvari čini škrob. Sastav gomolja krumpira vidljiv je u tablici 2.2.1. Krumpir sadrži i 0,1 % masti, 0,2% kiselina, 0,1% fenolnih spojeva, 1,1% minerala, 0,6% pektinskih tvari i dr.

Krumpir je nezaobilazna namirnica u ljudskoj prehrani te se preporuča u dijetalnoj prehrani, kod probavnih smetnji, žučnih kamenaca, a u narodu se često koriste i oblozi od krumpira (Lešić i sur., 2004.).

Tablica 2.2.1. Sastav gomolja krumpira

SASTAV GOMOLJA	MINIMUM	MAKSIMUM	PROSJEK
VODA	66,4	80,6	72,4
SUHA TVAR	19,3	36,1	24,9
ŠKROB	11,6	28,7	18,9
ŠEĆER	0,3	6,4	1,2
CELULOZA	0,23	2,9	1,8
BJELANČEVINE	1,0	4,4	2,1
PEPEO	0,5	2,1	1,1

Izvor: Lešić i sur., 2004.

2.3. Tehnologija proizvodnje krumpira

2.3.1 Plodored

Sito i sur. (2015) navode da je plodored jedan od osnovnih načela proizvodnje krumpira. Pravilnim plodoredom mogu se spriječiti ili smanjiti napadi mnogih štetnih organizama, kao i poboljšati kvaliteta same proizvodnje i dobiti visoko kvalitetni proizvod.

Krumpir zahtjeva širi plodored jer kod suženog plodoreda dolazi do smanjenja prinosa i do veće pojave bolesti koje se prenose tlom (Lešić i sur., 2004). Krumpir bi trebalo uzgajati u plodoredu tako da na istu površinu dođe nakon tri do četiri godine jer se time smanjuje nakupljanje štetnika i bolesti te se postiže stabilniji prinos (Pospišil, 2010). U uskom plodoredu je veća mogućnosti od povećanja inokuluma *Verticillium* sp., obične krastavosti (*Actinomices scabies*), rizoktonije (*Rhizoctonia solan*) i cista nematoda. Uski plodored zbog kratkoće

vegetacije manje će utjecati na smanjenje prinosa sjemenskog krumpira nego jestivog krumpira, a nepoželjan je zbog povećanja bolesti i prisutnosti samoniklih biljaka iz prethodnog nasada. Krumpir ne bi trebalo saditi nakon drugih biljaka iz porodice pomoćnica kao što su duhan, rajčica, patlidžan i druge, a ni nakon okopavina (kukuruz, šećerna repa, povratne okopavine i dr.). Kukuruz nije dobar predusjev za krumpir jer može doći do toksičnosti uslijed rezuida herbicida primijenjenih na kukuruzu. Šećerna repa također nije dobar predusjev za krumpir jer kasno napušta tlo i prilikom vađenja šećerne repe dolazi do većeg zbijanja tla što se negativno odražava na njegovu strukturu (Pospišil, 2010). Dobar predusjev za krumpir jesu ozime ili jare žitarice koje rano ostavljaju zemljište slobodnim za obradu i pripremu tokom jesni i zime. Višegodišnje krmne kulture (djetelina, lucerna, i djetelinsko travne smjese) najbolje su predkulture za krumpir jer popravljaju strukturu zemljišta i ostavljaju u tlu velike količine organske mase, a njihova negativna strana može biti pojačani napad zemljišnih štetnika (žičnjaci, grčice i sovice) (Lešić i sur., 2004).

2.3.2 Obrada tla

Lešić i sur. (2004) navode da krumpir ima iznimne zahtjeve za prozračnim, strukturiranim i dubokim tlom. Na lakim tlima zbog slabog vodnog kapaciteta krumpir trpi zbog suše, a na teškim tlima od nedovoljne aeracije korijena. Kvalitetnom i pravovremenom obradom cilj je stvoriti prorahljeno tlo mrvičaste strukture s dobrim vodozračnim uvjetima jer dobro pripremljeno tlo omogućava nesmetan razvoj korijenovog sistema i gomolja. Duboka obrada tla obavlja se krajem ljeta ili početkom jeseni na dubinu od 25 do 30 centimetara (cm) radi boljeg smrzavanja tla i akumuliranja zimske vlage (Pospišil, 2010). Gnojenje stajskim gnojem i unošenje 50% fosfora i kalija obavlja se prije jesensko-zimskog oranja. Prije proljetne obrade unosi se u tlo druga polovica fosfora i kalija i 50% dušičnih gnojiva. Obrada tla mora biti kvalitetno obavljena jer omogućava dobar prohod stroja u sadnji i brzo klijanje i razvoj korijena, što je uvjet za jednakomjerno nicanje gomolja (Sito i sur., 2015).

Dopunskom obradom se zatvara zimska brazda, uništava korov te se priprema sjetveni sloj za sadnju gomolja krumpira. Priprema tla obavlja se na dubini 10 – 15 cm što ostavlja rahlo i usitnjeno tlo (Sito i sur., 2015).

2.3.3 Gnojidba

Za rast i razvoj krumpiru potrebna su 14 hraniva koja uključuju mikrohraniva (Cl, Fe, Mn, B, Zn, Cu, Mo i Ni) i makrohraniva (N, P, K, Ca, Mg i S). Nedostatak mikro i makrohraniva tijekom vegetacije negativno djeluje na rast, razvoj i prinos krumpira (Pospišil, 2010). Pospišil, (2010) navodi da se u osnovnoj obradi dodaju NPK gnojiva sa povećanim sadržajem fosfora i kalija (NPK 7:20:30, NPK 10:30:20, NPK 8:26:26). Dušik se dodaje u obliku gnojiva UREA (46 % N), a prihrana se obavlja KAN-om (27 % N). Stajski gnoj se dodaje prije osnovne obrade tla. Krumpir je kultura koja dobro reagira na primjenu stajskog gnoja prije duboke obrade tla jer se ta tla

lakše zagrijavaju i time se omogućava sadnja rane sorte krumpira. Stajski gnoj se primjenjuje u količini od 20 do 40 t/ha ovisno o svojstvima tla, svrsi uzgoja i svojstvima sorte.

2.3.4 Sadnja

Prije sadnje gomolji moraju proći fiziološku dob mirovanja. To u Hrvatskoj nije problem ni s domaćim niti s uvoznim nizozemskim sjemenom. Gomolji za proizvodnju ranog krumpira, koji se najranije nabavljaju i stavljaju na naklijavanje često se režu, čime se ujedno prekida mirovanje (Lešić i sur., 2004).

Za postizanje visokih prinosa krumpira, potrebno je koristiti kvalitetno sjeme pravilno izabrane sorte s obzirom na dužinu vegetacije. Prinos krumpira može se povećati i uvođenjem novih sorti koje su vrlo prinosne sorte otporne na sušu i bolesti. Na sortnoj listi Republike Hrvatske 2009. godine ima upisanih 168 sorata krumpira. Za sadnju se koristi aprobirani sadni materijal (sjemenski krumpir) C1 kategorije. Gomolji krumpira moraju biti zdravi, zreli, neoštećeni, sortirani po krupnoći (Pospišil, 2010).

Prema Pospišil (2010) krumpir se sadi kada se tlo na dubini od 10 cm zagrije na 6 do 8 °C. Kod prerane sadnje u hladno i vlažno tlo, razdoblje od sadnje do nicanja je predugo i usjev je često prorijeđen. Rokovi sadnje u Hrvatskoj su različiti za pojedina područja (Pospišil, 2010). Vrijeme sadnje u kontinentalnim krajevima Hrvatske je od sredine ožujka do sredine travnja, a u gorskim predjelima od početka do kraja travnja (Sito i sur., 2015).

Sadnja krumpira se treba obaviti na ujednačenu dubinu radi ujednačenog nicanja. Na teškim i vlažnim tlima, krumpir se sadi pliće, a na lakšim tlima dublje (Pospišil, 2010).

Sadnja krumpira kod malih površina obavlja se ručno, a na većim površinama poluautomatskim ili automatskim sadilicama i specijalnim sadilicama za naklijale gomolje. Razmak između redova je od 62 do 70 (75) cm, a unutar reda od 30 do 55 cm. Gustoća sklopa za proizvodnju konzumnog krumpira srednje ranih di srednje kasnih sorata je 15 do 20 stabljika po metru kvadratnom (m^2).

2.4. Suvremena proizvodnja krumpira

Suvremeni uzgoj krumpira ide u pravcu korištenja uređaja, alata i najmodernijih tehnologija visoke preciznosti s ciljem ostvarivanja najveće moguće produktivnosti. Za preciznu i ekonomičnu proizvodnju krumpira u današnje vrijeme neizostavna je upotreba globalnog pozicijskog sustava (GPS) za navođenje strojeva i opreme na polju, prilikom obrade tla, prihrane, mjera zaštite bilja, ali i za prikupljanje podataka o prinosu uzgojne kulture u konkretnim uvjetima, statusu plodnosti tla i slično. Temeljni cilj suvremenog uzgoja krumpira je točno, precizno i selektivno osigurati svakoj biljci optimalne uvjete za rast i razvoj, istovremeno smanjiti negativan utjecaj na okoliš radi prekomjerne primjene mineralnih gnojiva i kemijskih sredstava za suzbijanje štetnih organizama, rezultat čega je ekonomičnija

proizvodnja uz značajne uštede na repromaterijalu, radu ljudi i strojeva i uštede u potrošnji energije (Sito i sur., 2015).

2.5. Bolesti na krumpiru

2.5.1 Virusne bolesti krumpira

Veliki problem u proizvodnji krumpira čine bolesti, posebice virusi koji se iz godine u godinu akumuliraju u krumpiru zbog vegetativnog načina razmnožavanja. Prinos i kvaliteta krumpira su zbog virusnih bolesti jako smanjeni. Virus uvijenosti lišća krumpira (PLRV), S virus krumpira (PVS) i Y virus krumpira (PVY), su prema Li i sur. (2018), najštetniji virusi koji napadaju krumpir.

1. Virus uvijenosti lišća krumpira (*Potato leafroll virus*, PLRV)

PLRV se prenosi zaraženim gomoljima, ali i pomoću lisnih uši na prezistentan način. Simptomi se razlikuju ovisno o tome da li se radi o primarnim ili sekundarnim infekcijama. Primarne infekcije se odnose na zaraze lisnih uši na zdravim biljkama. Simptomi primarnih infekcija su blijedi gornji listovi koji zauzimaju uspravan položaj, a uvijaju se i pocrvene po obodu (slika 2.5.1.1.). Donji listovi mogu, ali i ne moraju pokazivati simptome. Sekundarne infekcije se odnose na simptome koji se razvijaju sadnjom zaraženih gomolja. Simptomi sekundarni infekcije su: uvijenost donjih listova i kožaste konzistencije te cijela biljka zaostaje u razvoju (posebno u visinu, slika 2.5.1.2.) (Vončina, 2013).



Slika 2.5.1.1. Žućenje i uvijanje rubova listova prema gore kao posljedica zaraze PLRV
(Izvor: Vončina, 2013)



Slika 2.5.1.2. Zaostajanje u rastu kao posljedica zaraze PLRV
(Izvor: Vončina, 2013)

2. Y- Virus krumpira (Potato virus Y, PVY)

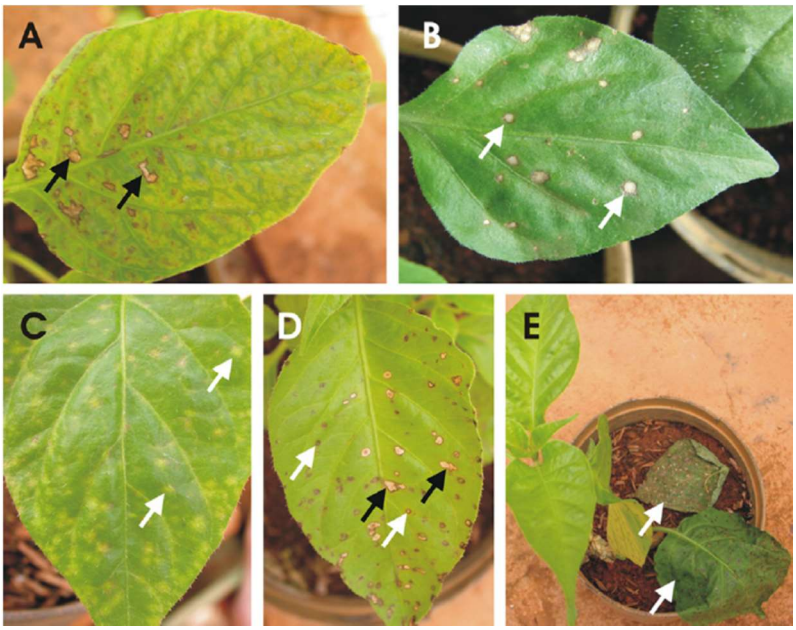
Y- virus krumpira se prenosi na neprezistentan način. Prenose ga lisne uši kod kojih se virus zadržava na vanjskoj strani usnog ustroja, ali se može prenositi i pomoću zaraženog sadnog materijala te mehaničkim prijenosom oštećivanjem biljaka prilikom prolaska mehanizacije ili korištenjem različitih oruđa. Poznato je više sojeva ovog virusa (C, N, O i njihovi hibridi) koji na krumpiru uzrokuju različite simptome. Nekrotizirajući (N) soj kod vrlo osjetljivih kultivara uzrokuje nekroze na listovima koje mogu rezultirati potpunim sušenjem lisnih plojki (slika 2.5.1.3.) koje mogu ostati visjeti na stabljici, dok kod manje osjetljivih kultivara uzrokuje blage simptome. Obični (O) soj uzrokuje mozaične promjene na listovima, dok C soj uzrokuje deformacije lišća, nekroze žila te lomljivost stabiljki i peteljki (Vončina, 2013).



Slika 2.5.1.3. Potato virus Y
Izvor: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTUfMCGktVkYvku5fJR1m5qUkBJ_4bRx9cX2Q&usqp=CAU - pristup: 23.08.2021.

3. X-Virus krumpira (Potato virus X, PVX)

Domaćini ovog virusa su rajčica, paprika i duhan s kojih je moguć prijenos pomoću kukaca, ali i mehanički. Simptomi virusa su mozaične promjene i žućenje listova smanjene veličine (slika 2.5.1.4.), a na gomoljima se pojavljuju nekroze (Vončina, 2013).



Slika 2.5.1.4. Simptomi PVX
Izvor: https://www.researchgate.net/profile/Luiz-Pereira-3/publication/23189358/figure/fig3/AS:310553085005826@1451053033280/Symptoms-induced-by-Potato-virus-X-PVX-constructs-and-wild-type-Tomato-spotted-wilt.png - pristup: 23.08.2021.

4. A-Virus krumpira (Potato virus A, PVA)

A virus krumpira prenose neke vrste lisnih uši na neprezistentan način, ali i druge biljne vrste. Rajčica, paprika, duhan i petunija mogu poslužiti kao izvor zaraze. Simptomi su najčešće u obliku blagog mozaika te slabe deformiranosti i naboranosti listova uslijed nejednakog rasta lisne plojke. PVA može smanjiti prinos i do 40% no ne kod pojedinačnih infekcija, nego u kombinaciji s drugim virusima (Vončina, 2013).

5. S-Virus krumpira (Potato virus S, PVS)

Najčešće se ovaj virus prenosi korištenjem zaraženog sadnog materijala, ali je mogući i prijenos lisnim ušima na neprezistentan način. Simptomi koji se mogu javiti u slučaju ranih infekcija su produbljivanje žila, blaga pjegavost ili sitne nekrotične pjege na listovima čija površina postaje gruba te otvoreni tip rasta grmova. Starenjem biljke krumpira postaju otporne na PVS (Vončina, 2013).

2.6. Biotehnološke metode na krumpiru

Krumpir (*Solanum tuberosum*) je vrlo važna namirnica, a njegova je proizvodnja vrlo niska i ne zadovoljava ljudske potrebe. Jedan od razloga zbog kojih se ne mogu zadovoljiti ljudske potrebe su zaraženi gomolji krumpira jer se nakon berbe zaraženo sjeme (gomolj) koristi za sljedeću proizvodnju. Mikro tehnike razmnožavanja krumpira se koriste za dobivanje gomolja bez bolesti koji kasnije koriste proizvođači krumpira (Sahid, 2018). Prema Li i suradnicima (2018), biotski stres koji je uzrokovan virusima te abiotski stres, bili su i jesu i dalje dva glavna ograničenja za održivi razvoj svjetske proizvodnje krumpira.

Razmnožavanje u *in vitro* uvjetima

Kultura *in vitro* je postupak koji podrazumijeva rast vrlo sitnih organa, komadića tkiva ili izoliranih stanica u aseptičkim (sterilnim) uvjetima. Sam naziv označava uzgoj kultura u staklu ili prozirnim posudama. Ovaj način razmnožavanja se često naziva i mikrorazmnožavanje jer su biljni organi ili cijele biljke u minijaturnim dimenzijama, u odnosu na generativnu proizvodnju. Sam postupak *in vitro*, osigurava vrlo brz proces dobivanja velikog broja serija biljaka, koje su iste po razvoju, rastu i genetičkom potencijalu vrste. To je proces kloniranja jer sve proizvedene biljke predstavljaju kopije razmnoženog majčinskog uzorka (Pintarić, 2008). *In vitro* razmnožavanje krumpira (*Solanum tuberosum*) se koristi za proizvodnju sjemenskih gomolja bez virusa (Momena i sur., 2014). Prema Sakeru i sur. (2012), Murshige i Skoog (MS) medij se najčešće koristi za brzi rast stanica, tkiva i organa biljke. Koriste se i mikro i makro nutrijenti u medijima za kulturu tkiva koji mogu imati dobar učinak na metabolizam biljke. Mioinozitol se dodaje u medij za uzgoj u malim količinama (100 mg/L) jer ima veliku ulogu u mnogim biosinetskim putevima te poboljšava rast stanica. U medije se dodaju i vitamini B-kompleksa: timin HCl (B_1), nikotinska kiselina (B_3) te piridoksin HCl (B_6) za poboljšanje zdravog rasta tkiva u kulturi. Vitamini imaju katalitičku ulogu u metabolizmu stanica jer su čimbenik dodatne opskrbe hranom, ali i njihovi zahtjevi variraju od vrste do vrste. Šećeri se dodaju u medij kao izvor ugljika. Za proizvodnju dovoljnog broja zdravih biljaka krumpira, npr. nakon primjene kulture meristema (u svrhu oslobađanja biljaka od virusa), zdrave biljke je potrebno dalje *in vitro* razmnožiti. Razmnažati se mogu (1) mikropropagacijom koja rezultira proizvodnjom zakorijenjenih biljaka *in vitro* koje se zatim sade u staklenik radi proizvodnje zdravih mikrogomolja ili (2) mikrotuberizacijom kojom se proizvode mali mikrogomolji u *in vitro* uvjetima. Takvi se mikrogomolji također mogu koristiti za daljnju proizvodnju minigomolja u zaštićenom prostoru.

2.6.1 Mikropropagacija

Mikropropagacija se pokazala vrlo učinkovitom tehnikom za ubrzavanjem proizvodnje visokokvalitetnih biljaka bez patogena, u smislu genetske i fiziološke ujednačenosti jer je potražnja za biljkama, posebno u svrhu hrane i lijekova, jedan od glavnih uzroka iscrpljivanja njihovih staništa (Saker i sur., 2012). Mikropropagacija je postupak u kojem se za kultiviranje koriste vršni ili pazušni (aksilarni) pupovi. Mikropropagacija se zasniva na dodavanju citokinina s ciljem aktiviranja postojećih pazušnih pupova, odnosno izazivanja izduživanja njihovih internodija i formiranja listova, a potom i novih pupoljaka u njihovom pazuhu. Karakteristika mikropropagacije je u tome da se kulture održavaju kao takozvane „kulture izdanaka“ koje u pravilu nemaju korijenov sustav, sve dok se za tim ne ukaže potreba (Pintarić, 2008). Krumpir se može mikropropagirati uz dodatak regulatora rasta (Azad i sur., 2020) ili na mediju bez hormona (Saker i sur., 2012). Za prvi i drugi način kao eksplantati se obično koriste jednonodalni segmenti. Kad se za mikropropagaciju ne koriste regulatori rasta već se želi postići izduživanje izdanaka, a kod krumpira istovremeno i zakorijenjivanje, metoda se naziva – metoda pojedinačnih nodijskih segmenata. Kad se koriste citokinini kao regulatori rasta, želi se potaknuti aksilarno grananje tj. formiranje više izdanaka iz jednog eksplantata. Metoda se tada naziva – metoda aksilarnog grananja. Za mikropropagaciju se najčešće koristi 2 do 3% saharoze (Saker i sur., 2012). Prema Saker i sur. (2012), temperature od 20 do 25°C potiču mikropropagaciju biljaka. Fotoperiod, intenzitet i spektar svjetlosti mogu se koristiti za kontrolu rasta *in vitro* krumpira, čime se u nekim slučajevima izbjegava korištenje regulatora rasta. Za *in vitro* razmnožavanje krumpira najčešće se koriste hladno bijela svijetlost te Grolux fluorescentne svjetiljke. Fotoperiod od 16 sati dan/8 sati noć se preporuča za optimalan rast i vegetativni razvoj sadnica krumpira *in vitro*.

2.6.2 Mikortuberizacija

Korištenje *in vitro* gomolja (mikrogomolja), kao krajnjeg produkta mikropropagacije krumpira, uz ili umjesto *in vitro* biljaka, ima nekoliko prednosti u proizvodnji sjemenskog krumpira. Upotreba mikrogomolja pri skladištenju i razmjeni germplazme i sjemena krumpira je povoljna jer se mikrogomolji mogu duže skladištiti i lakše ih je čuvati i transportirati nego sadnice (Dobránszki i sur., 2008). Problem je međutim što proizvodnja mikrogomolja traje duže od obične mikropropagacije biljaka te tako dobiveni gomolji mogu biti različito dugi period dormantni.

Prema Dobránszki i sur. (2008), postoje dva moguća načina poticanja tuberizacije *in vitro*. Prvi je upotrebom regulatora rasta koji se dodaju u medij, a drugi je izmjena okolišnih čimbenika, poput fotoperioda, intenziteta svjetla kako bi se promijenila hormonska ravnoteža *in vitro* biljaka ili se mogu kombinirati oba načina. Prema Momena i sur. (2014), mikrotuberizacija ovisi o nizu čimbenika, uključujući koncentraciju saharoze, temperaturu, fotoperiod, intenzitet svjetla i sortu. Dobránszki i sur. (2008) navode da okolišni čimbenici, odnosno svjetlost u koju spada fotoperiod, intenzitet svjetla i valna duljina te temperatura, su

najčešće proučavani čimbenici okoliša u odnosu na *in vitro* tuberizaciju. Studije o učincima svjetla na mikrotuberizaciju su započele 1970-ih. Primjenjuju se tri različite kombinacije svjetlosti: dugi dan koji traje 16 sati (h), kratki dan (8h) te mrak (0h). Navode da su u kratkom danu mikrogomolji napredovali, dok je mrak imao mali utjecaj na razvoj mikrogomolja.

Prema Sahid i sur. (2018), saharoza i kinetin imaju ključnu ulogu u stvaranju mikrogomolja. Povećanjem koncentracije saharoze može se povećati proizvodnja mikrogomolja. Upotrebom regulatora rasta u mikrotuberizaciji krumpira dobivene su značajne varijacije (Momena i sur., 2014). Kinetin, kao regulator rasta, ima pozitivan utjecaj na mikrotuberizaciju. On povećava broj mikrogomolja zbog svog učinka produženja stanica, ali ne uzrokuje značajne promjene u veličini gomolja, u rastu, promjeru i težini mikrogomolja. Također, Sahid i sur. (2018) navode da je utjecaj 6-benzilaminopurina (BAP) na veličinu mikrogomolja bio veći nego sadržaj kinetina. Odgovarajuća veličina i težina, odnosno masa mikrogomolja koje su usko povezane, može se postići prikladnom kombinacijom kinetina i BAP-a (Momena i sur., 2014).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

U ovom istraživanju korišten je tradicijski kultivar krumpira Brinjak uzgojen na pokušalištu Maksimir (Zavod za specijalnu proizvodnju bilja) u okviru projekta „Nacionalni program očuvanja i održive uporabe biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu u Republici Hrvatskoj“.

3.2. Metode

3.2.1 Uspostava *in vitro* kulture

Za pripremu početnih eksplantata korištene su klice naklijalih gomolja krumpira. Klice su otkinute s gomolja, prenesene u laboratorij te podvrgnute sterilizaciji. Sterilizirane su u staklenoj laboratorijskoj čaši 70% etilnim alkoholom 1 minutu, a zatim u 4% otopini Izosana G (Pliva) 15 minuta. Klice su potom isprane četiri puta u sterilnoj destiliranoj vodi. Postupak sterilizacije kao i svi daljnji koraci s kulturom tkiva provedeni su u laminaru s horizontalnim protokom sterilnog zraka. Iz tako steriliziranih klica, pod stereomikroskopom su izolirani pupovi veličine oko 5 mm i postavljeni u petrijeve posudice na Murashige i Skoog medij (Murashige i Skoog, 1962) bez regulatora rasta u kojeg je dodano 7 g/l Plant agara (Duchefa). Kultura je uzgajana na svjetlu, uz fotoperiod 16 h dan/8 sati noć i temperaturi 24 °C. Nakon 8 dana izdanci koji su počeli rasti preneseni su na isti sastav medija, ali u veće i ventilirane sterilne posudice za *in vitro* kulturu te kultivirani pri istim uvjetima. Izduženi izdanci su nakon mjesec dana rezani na nodalne segmente te supkultivirani na svježi MS medij bez regulatora rasta kako bi se dobilo dovoljno biljnog materijala za postavljanje pokusa.

3.2.2 Postavljanje pokusa mikropropagacije

U svrhu ispitivanja uspješnosti mikropropagacije krumpira na različitim sastavima regulatora rasta te na mediju bez hormona, pripremljen je MS medij uz dodatak regulatora rasta kao što je prikazano u tablici 3.2.2.1. Mediji različitog sastava predstavljaju tretmane.

Tablica 3.2.2.1. Tretmani (mediji) korišteni za mikropropagaciju

Tretman	Sastav medija
HFM	MS makro i mikro elementi, MS vitamini, 0,1 g/l inozitola, 30 g/l saharoze, Plant agar 7 g/l, pH 5,8
GA3	HFM + 2,5 mg/l giberelinske kiseline (GA_3)
GA3+NAA	HFM + 2,5 mg/l GA_3 + 0,01 mg/l 1-naftalenoctene kiseline (NAA)
GA3+BAP	HFM + 2,5 mg/l GA_3 + 0,5 mg/l 6-benzilaminopurina (BAP)

Nakon autoklaviranja 25 minuta pri 121 °C i tlaku 1 bara, mediji su izlijani u sterilne ventilirane posudice za *in vitro* kulturu biljnog tkiva (100 ml u svaku).

Jednonodalni segmenti s pripadajućim listom izrezivani su od izdanaka mikropropagiranih na mediju bez hormona (HFM) i postavljani na različite medije. Svaki medij bio je zastupljen sa po pet kutija, a u svaku je bilo postavljeno po devet jednonodalnih segmenata (ukupno 45 po tretmanu) jednakomjerno raspoređenih. Kultura je uzgajana na svjetlu, uz fotoperiod 16 h dan/8 sati noć i temperaturi 22 °C. Uspješnost mikropropagacije procijenjena je nakon 30 dana mjerenjem dužine izdanaka i brojanjem novoformiranih nodija po izdanku. Procijenjena je također i uspješnost zakorijenjivanja brojanjem zakorijenjenih izdanaka i mjerenjem dužine korijena.

3.2.3 Postavljanje pokusa mikrotuberizacije

Za mikrotuberizaciju pripremljena su dva medija različita po sadržaju regulatora rasta (tablica 3.2.3.1).

Tablica 3.2.3.1. Tretmani (mediji) korišteni za mikrotuberizaciju

Tretman	Sastav medija
HFM-Mt	MS makro i mikro elementi, MS vitamini, 0,1 g/l inozitola, 80 g/l saharoze, Bacto agar 7 g/l, pH 5,8
KIN4 BAP1	HFM-Mt + 4 mg/l kinetina (KIN) + 1 mg/l BAP

Eksplantati tj. jednonodalni segmenti bez plojke dužine 0.5-1 cm izrezani su u laminaru od *in vitro* uzgajanih izdanaka te položeni u medij. Na svaki od medija (tretmana) postavljeno je po 70 eksplantata u sedam ventiliranih kutija (10 eksplantata po kutiji). Prvih 18 dana eksplantati su kultivirani pri fotoperiodu 16 h dan/ 8 h noć (dugi dan) na 24 °C, a zatim su po tri kutije po tretmanu postavljene u potpuni mrak na 20 °C, a po četiri kutije na kratki dan – 8 h dan/ 16 h noć također na 20 °C. Nakon pet tjedna analizirana je uspješnost

mikrotuberizacije. Izdanci su vađeni iz ventiliranih kutija te su bilježeni/mjereni slijedeći podaci: broj formiranih izdanaka po kutiji, broj izdanaka s formiranim mikrogomoljima, broj mikrogomolja po kutiji, masa mikrogomolja po kutiji te promjer svakog mikrogomolja (mjereno digitalnim pomičnim mjerilom).

Iz ovih podataka izračunate su slijedeće varijable (svojstva):

1. postotak izdanaka s formiranim mikrogomoljima,
2. prosječan broj mikrogomolja po izdanku,
3. prosječna masa mikrogomolja po izdanku (mg)
4. prosječan promjer mikrogomolja (mm).

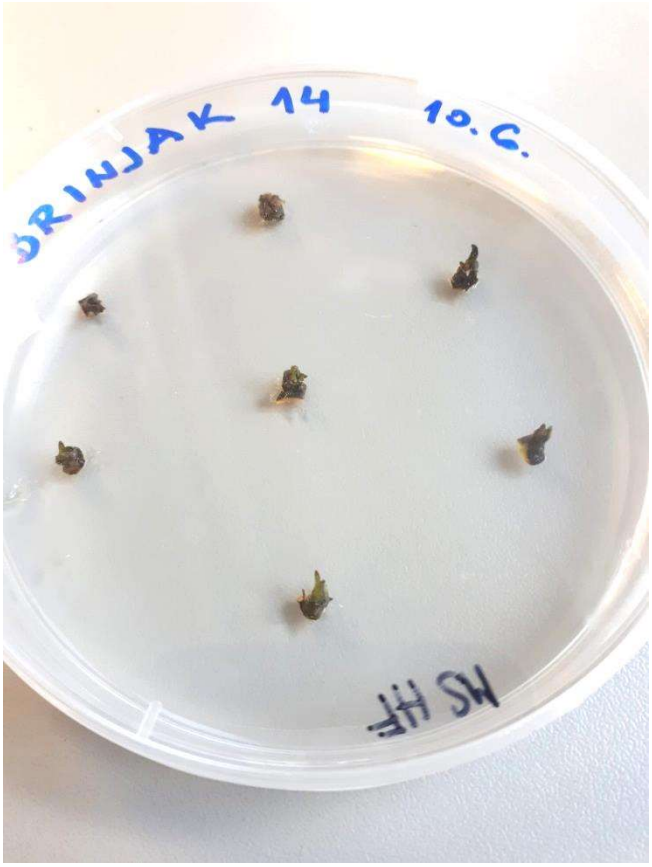
3.3. Statistička obrada podataka

Kvantitativni podaci dobiveni mikropropagacijom i mikrotuberizacijom su analizirani pomoću jednosmjerne i/ili dvosmjerne analize varijance (ANOVA) te Duncan-ovog testa višestrukih usporedbi. Statistička analiza podataka provedena je programskim softverom SAS 9.4.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Uspostava *in vitro* kulture

Od ukupno 30 postavljenih pupova u pet petrijevih zdjelica, nakon 8 dana njih 25 je počelo rasti što čini 83 % postavljenih eksplantata (slika 4.1.). Kontaminacije bakterijama ili gljivicama nije bilo.



Slika 4.1. Pupovi postavljeni u *in vitro* kulturu-početak rasta

4.1. Mikropropagacija

Uspješnost mikropropagacije na pojedinim tretmanima analizirana je mjesec dana od postavljanja eksplantata u medij mjerenjem dužine izdanaka i brojanjem nodija. Već vizualnim promatranjem bilo je vidljivo da su izdanci na nekim tretmanima puno kraći od drugih. Podaci za dužinu izdanaka i broj nodija za četiri tretmana, odnosno za četiri različita sastava medija (HMF, GA3, GA3+BAP i GA3+NAA) analizirani su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA). Iz tablice 4.1.1. možemo iščitati da je tretman visoko signifikantno utjecao na dužinu izdanaka i broj nodija po izdanku.

Tablica 4.1.1. Značajnost efekta za uspješnost mikropropagacije

Izvor varijabilnosti	DF	**Dužina izdanaka**		**Broj nodija/izdanku**	
		F vrijednost	Pr > F	F vrijednost	Pr > F
Tretman	3	33.84	<.0001**	16.78	<.0001**

U tablici 4.1.2. vidimo dužinu izdanaka prikazanu u milimetrima (mm) i broj nodija po izdanku u ovisnosti o tretmanu. Najveća dužina izdanaka postignuta je u mediju GA3+NAA (90,4 mm) iako je i u mediju sa samim GA3 postignut dobar rezultat (84,7 mm) (slika 4.1.1. i 4.1.2.). Ovi rezultati u skladu su sa činjenicom da je GA3 fiziološki uključen u produljivanje stanica. Zato tretmani s GA3 rezultiraju dužim izdancima. Rezultati ova dva medija se prema Duncan-ovom testu ne razlikuju značajno. Značajno manju visinu postigli su izdanci koji su rasli na HFM i na GA3+BAP (slika 4.1.3. i 4.1.4.). Kad je dakle GA3 bio u kombinaciji s citokininom 6-benzilaminopurinom (BAP), pa makar i u niskoj koncentraciji (0.5 mg/l), visina izdanaka ostala je mala, a listovi na izdancima bili su sitni. Ovo je u skladu s rezultatima Nuwagira i sur. (2015) koji su istraživali različite kombinacije i koncentracije GA3, NAA i BAP-a u poticanju mikropropagacije krumpira. Veća koncentracija GA3 u kombinaciji s NAA davala je visoke stabljike *in vitro* izdanaka i veći broj nodija, međutim u kombinaciji s BAP-om dužina izdanaka i broj nodija bili su manji. Najveći broj nodija po izdanku postignut je u mediju s GA3+NAA (9,0), ali također i u HMF mediju (8,4). Što se kvalitete izdanaka tiče, vidljivo je da su izdanci mikropropagirani na tretmanu GA3+BAP loše kvalitete, s formiranim kalusom pri bazi izdanaka i loše razvijenim korijenom ili bez njega (slika 4.1.3.).

Tablica 4.1.2. Dužina izdanka i broj nodija po izdanku u ovisnosti o tretmanu

Tretman	Dužina izdanaka (mm)	Broj nodija/izdanku
HFM	54,3 B*	8,4 B
GA3	84,7 A	7,4 C
GA3+BAP	59,6 B	6,9 C
GA3+NAA	90,4 A	9,0 A

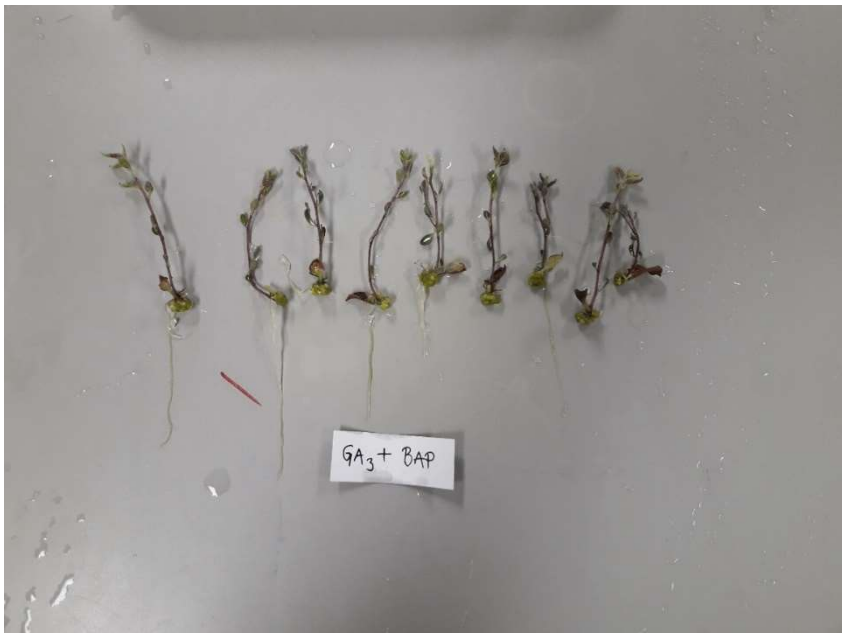
*Vrijednosti označene istim slovom unutar kolone ne razlikuju se značajno prema Duncan-ovom testu.



Slika 4.1.1. Mikropropagacija na tretmanu GA3+NAA



Slika 4.1.2. Mikropropagacija na tretmanu GA3



Slika 4.1.3. Mikropropagacija na tretmanu GA3+BAP



Slika 4.1.4. Mikropropagacija na tretmanu HMF

4.2. Dužina korijena i postotak zakorijenjivanja

Dužina korijena i postotak zakorijenjivanja analizirani su pomoću jednosmjerne analize varijance i Duncan-ovog testa. Rezultati analize varijance pokazuju da tretman tj. sadržaj regulatora rasta u mediju visoko signifikantno utječe na oba svojstva (tablica 4.2.1.).

Tablica 4.2.1. Značajnost efekta za uspješnost zakorijenjivanja izdanaka i postotka zakorijenjivanja

Izvor varijabilnosti	DF	**Dužina korijena**		**Postotak zakorijenjivanja**	
		F vrijednost	Pr > F	F vrijednost	Pr > F
Tretman	3	33.44	<.0001**	19.79	<.0001**

Vrijednosti za dužinu korijena (mm) i postotak zakorijenjivanja (%) prikazane su u tablici 4.2.2. Dužina korijena bila je najveća u HMF mediju (144,5 mm), a najmanja u mediju GA3+BAP (47,1 mm) (Slike 4.1.4. i 4.1.3.). Dužine korijena u mediju s GA3 (121,0 mm) i GA3+NAA (107,9 mm) nisu se međusobno značajno razlikovale (tablica 4.2.2. i slike 4.1.2. i 4.1.1.)

Postotak zakorijenjivanja bio je najbolji u GA3 mediju (100,0 %), međutim, postotak zakorijenjenih biljaka u HMF mediju (97,8 %) i GA3+NAA mediju (88,99%) također su vrlo visoki i ne razlikuju se značajno od postotka u mediju s GA3. Najmanji postotak zakorijenjivanja postignut kombinacijom regulatora rasta GA3+BAP.

Tablica 4.2.2. Postotak zakorijenjivanja i dužina korijena u ovisnosti o tretmanu

Tretman	Dužina korijena (mm)	Postotak zakorijenjivanja
HFM	144,5 A*	97,8 A
GA3	121,0 B	100,0 A
GA3+NAA	107,9 B	88,9 A
GA3+BAP	47,1 C	60,5 B

*Vrijednosti označene istim slovom unutar kolone ne razlikuju se značajno prema Duncan-ovom testu.

Aklimatizacija je završni i ključan korak u dobivanju dovoljnog broja kvalitetnih biljaka. Obzirom da je za uspješnost aklimatizacije biljaka, nakon prijenosa u *in vivo* uvjete, vrlo je bitan korijen, bez obzira na manju visinu izdanaka, HFM bi se, zbog dužine i razgranatosti korijena (slika 4.1.4.) mogao izdvojiti kao najbolji tretman za mikropropagaciju krumpira. Izdanci na mediju GA3, iako nešto manje dužine korijena (slika 4.1.2.), zakorijenili su 100% što pokazuje da je i ovaj tretman pogodan za mikropropagaciju. Tretman GA3+NAA, iako je dao najviše izdanke s najvećim brojem nodija mogao bi se preporučiti za multiplikaciju *in vitro* (dao bi

najbolju stopu umnažanja), međutim previsoki izdanci, a pri tom nešto slabije razvijenog korijena nisu pogodni za sadnju i aklimatizaciju. Zato bi zadnju supkultivaciju eksplantata za razvoj biljaka koje će biti sađene u supstrat umjesto na GA3+NAA tretmanu bilo bolje provesti na tretmanima HFM ili GA3.

4.3. Mikrotuberizacija

Mikrotuberizacija je provedena na dva različita tretmana (1) mediju bez hormona i (2) mediju s dodatkom BAP-a i KIN. U oba medija koncentracija saharoze bila je visoka (8%) jer je saharoza osmotik koji čak i u mediju bez regulatora rasta potiče tuberizaciju (Dobránszki i sur., 2008). Drugi faktor bilo je svjetlo pa je mikrotuberizacija provođena u mraku ili na kratkom danu (8 h dan/ 16 h noć). Nakon početnih 18 dana kultivacije svih eksplantata na dugom danu da bi se potaknuo razvoj izdanaka te 5 tjedana u različitim tretmanima svjetla pristupilo se je analizi mikrotuberizacije.

Podaci za četiri svojstva za procjenu uspješnosti mikrotuberizacije analizirani su dvosmjernom analizom varijance. Rezultati analize pokazali su da na svojstvo postotak izdanaka s mikrogomoljima značajno utječe tretman (T) i interakcija tretman $\times$ svjetlo (S).
Na broj mikrogomolja po izdanku nisu značajno utjecali niti T, niti S niti njihova interakcija (tablica 4.3.1.). Na promjer mikrogomolja značajno utječu T, S i interakcija T $\times$ S, a na masu mikrogomolja značajan utjecaj ima interakcija T $\times$ S (tablica 4.3.2.).

Tablica 4.3.1. Značajnost efekta za postotak izdanaka s mikrogomoljima i broj mikrogomolja po izdanku

Izvor varijabilnosti	DF	Postotak izdanaka s mikrogomoljima		Broj mikrogomolja po izdanku	
		F vrijed.	Pr > F	F vrijed.	Pr > F
Tretman (T)	1	17.08	0.001^{**}	1.53	$0.24^{n.s.}$
Svjetlo (S)	1	1.59	$0.23^{n.s.}$	0.56	$0.47^{n.s.}$
T $\times$ S	1	26.32	0.0002^{**}	0.36	$0.56^{n.s.}$

Tablica 4.3.2. Značajnost efekta za promjer mikrogomolja i masu mikrogomolja

Izvor varijabilnosti	DF	Promjer mikrogomolja (mm)		Masa mikrogomolja (mg)	
		F vrijed.	Pr > F	F vrijed.	Pr > F
Tretman (T)	1	27.72	0.0003**	4.38	0.06n.s.
Svjetlo (S)	1	8.31	0.01*	1.58	0.23n.s.
T × S	1	5.36	0.04*	5.82	0.03*

4.3.1 Postotak izdanaka s mikrogomoljima i broj mikrogomolja po izdanku

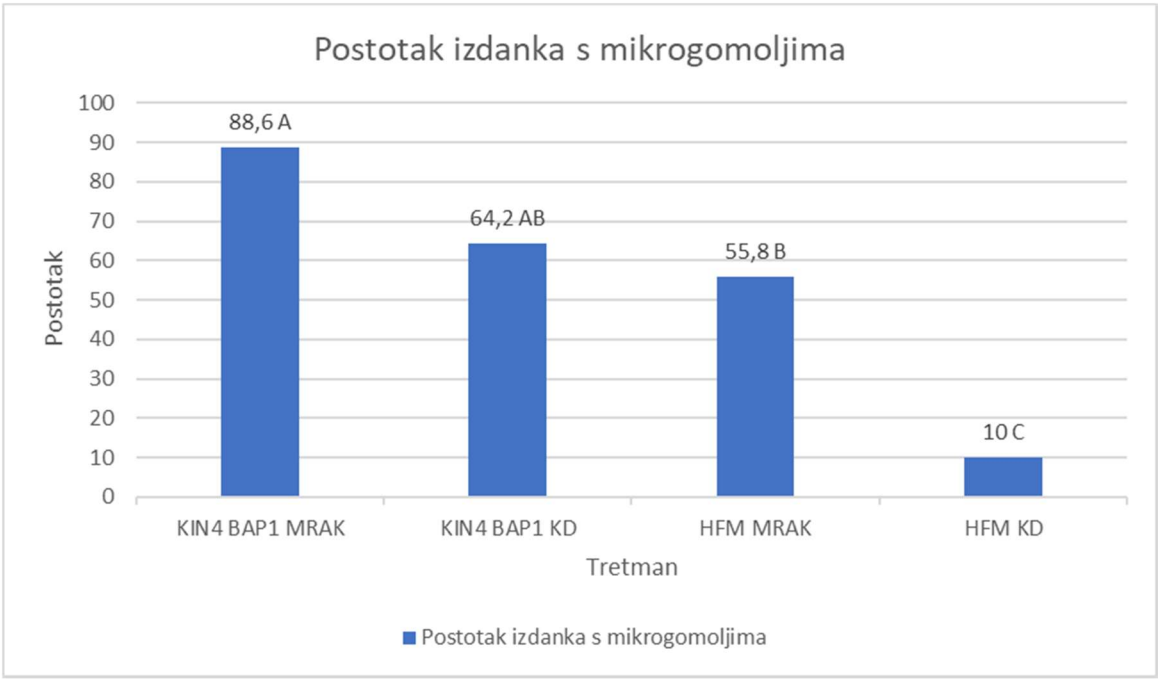
Značajno veći postotak izdanaka s mikrogomoljima dobiven je na tretmanu KIN4 BAP1 tj. mediju kojem je dodano 4 mg/l kinetina i 1 mg/l 6-benzilaminopurina u odnosu na tretman HFM-Mt tj. medij bez hormona (tablica 4.3.1.1.). Veći postotak izdanaka s mikrogomoljima na tretmanu s KIN i BAP-om dobili su također i Momena i sur. (2014) koji navode da kinetin povećava broj mikrogomolja zbog svog pozitivnog učinka na produženje stanica.

Tablica 4.3.1.1. Postotak izdanaka s mikrogomoljima u ovisnosti o tretmanu

Tretman	Postotak izdanaka s mikrogomoljima
KIN4 BAP1	69,8 A
HFM-Mt	37,1 B

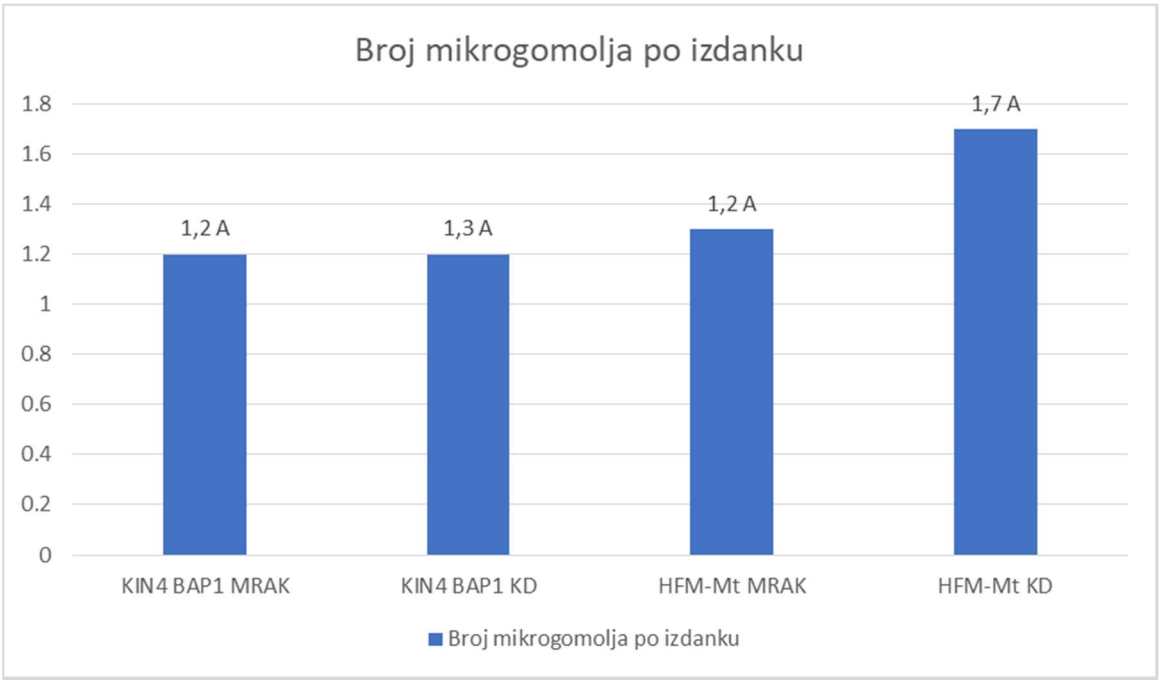
*Vrijednosti označene istim slovom unutar kolone ne razlikuju se značajno prema Duncan-ovom testu.

Obzirom na kombinirani učinak tretmana i svjetla, najveći broj izdanaka s formiranim mikrogomoljima dobiven je u tretmanu KIN4 BAP1 u mraku, dok je najmanji postotak izdanaka s mikrogomoljima (10%) formiran u tretmanu HFM-Mt u mraku (graf 4.3.1.1.).



Graf 4.3.1.1. Postotak izdanaka s mikrogomoljima

U grafu 4.3.1.2. vidimo rezultate broja mikrogomolja po izdanku. Iako među tretmanima postoji mala razlika u broju mikrogomolja po izdanku, ona nije značajna. Jednak i relativno veći broj mikrogomolja po izdanku dobiven je u tretmanu HFM-Mt na kratkom danu i KIN4 BAP1 tretmanu u mraku.



Graf 4.3.1.2. Broj mikrogomolja po izdanku

4.3.2 Promjer i masa mikrogomolja

U tablici 4.3.2.1. vidimo rezultate promjera mikrogomolja iskazane u milimetrima (mm) i mase mikrogomolja u miligramima (mg) u ovisnosti o tretmanu. Značajno veći promjer i masa mikrogomolja dobiveni su u tretmanu KIN4 BAP1 nego u tretmanu HFM-Mt (slika 4.3.2.1. i 4.3.2.2.). Sahid i sur. (2018) u svojem radu navode da su KIN i BAP poboljšali stvaranje mikrogomolja tako što je KIN potaknuo ranije stvaranje gomolja, dok je BAP utjecao na povećanu masu gomolja u usporedbi sa KIN. U radu Momene i sur. (2014) navodi se da je BAP imao najviše utjecaja na težinu i rast mikrogomolja. Navodi se da je kombinacija kinetina i BAP-a prikladna za postizanje optimalne veličine i mase mikrogomolja.

Tablica 4.3.2.1. Promjer i masa mikrogomolja u ovisnosti o tretmanu

Tretman	Promjer (mm)	Masa (mg)
KIN4 BAP1	4,8 A	101,2 A
HFM-Mt	3,0 B	44,8 B

*Vrijednosti označene istim slovom unutar stupca ne razlikuju se značajno prema Duncan-ovom testu.

U tablici 4.3.2.2. prikazani su rezultati promjera mikrogomolja u ovisnosti o svjetlu. Značajno veći promjer mikrogomolja dobiven je kod kratkog dana (KD) (4,1 mm) nego u mraku (3,3 mm). Prema Dobránszki i sur. (2008) zaključuju također da je kratki dan bolji za formiranje gomolja od mraka. Razlog tome je prerana senescencija mikro biljaka u mraku što onda posljedično reducira rast mikrogomolj. Masa mikrogomolja je također je bila nešto veća kad je mikrotuberizacija provođena na KD nego u mraku, ali se vrijednosti značajno ne razlikuju.

Tablica 4.3.2.2. Promjer i masa mikrogomolja u ovisnosti o svjetlu

Svjetlo	Promjer (mm)	Masa (mg)
KD	4,1 A	80,2 A
Mrak	3,3 B	57,5 B

*Vrijednosti označene istim slovom unutar stupca ne razlikuju se značajno prema Duncan-ovom testu.

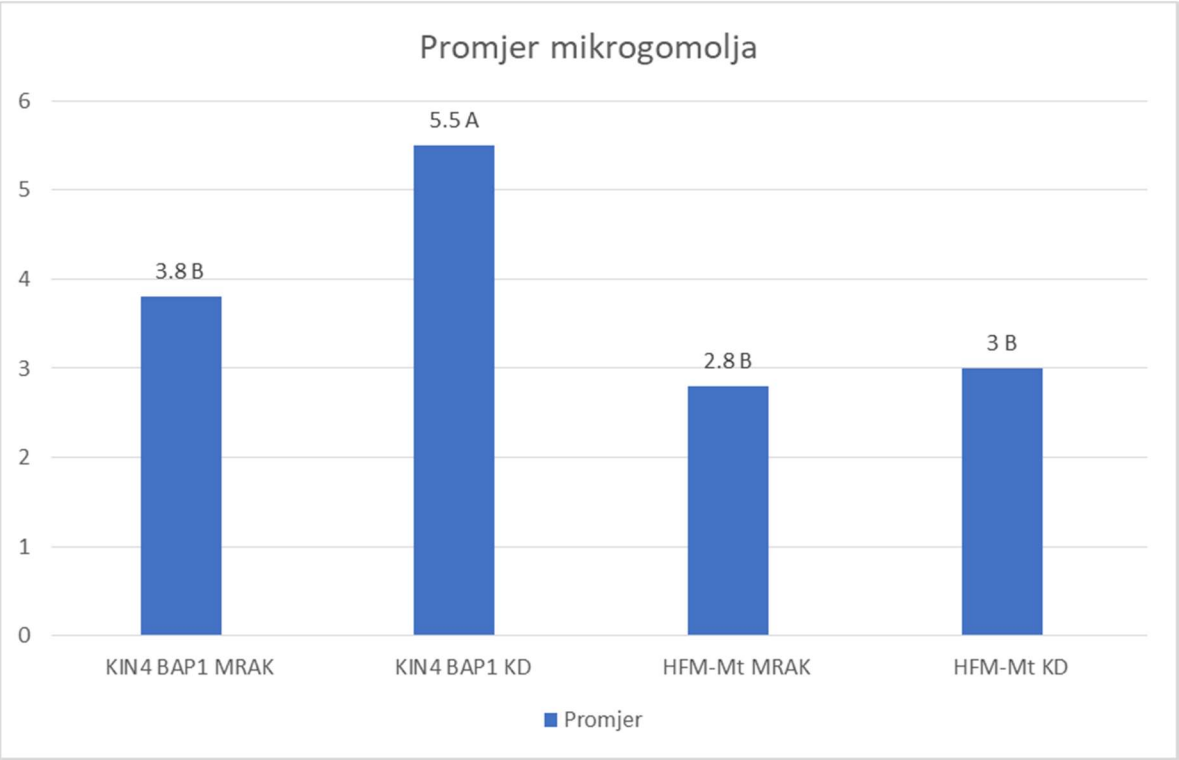


Slika 4.3.2.1. Mikrotuberizacija na tretmanu KIN_4BAP_1+mrak i HFM-Mt+mrak

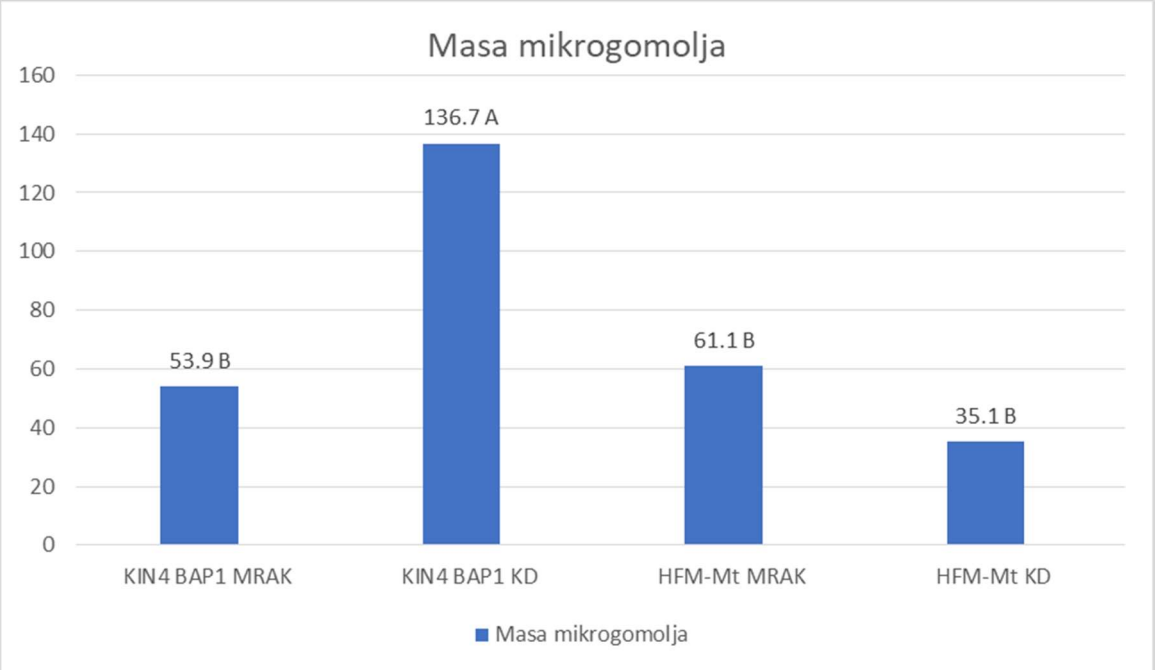


Slika 4.3.2.2. Mikrotuberizacija na tretmanu KIN_4BAP_1+KD i HMF-Mt+KD

Obzirom na kombinirani učinak tretmana i svjetla, značajno najveći i promjer (graf 4.3.2.1.) i masa mikrogomolja (graf 4.3.2.2.) dobiveni su na tretmanu KIN4 BAP1 na kratkom danu. Ostale kombinacije tretmana i svjetla dale su manje vrijednosti promjera i mase mikrogomolja i međusobno se nisu značajno razlikovale.



Graf 4.3.2.1. Promjer mikrogomolja u ovisnosti o kombiniranom učinku tretmana i svjetla



Graf 4.3.2.2. Masa mikrogomolja u ovisnosti o kombiniranom učinku tretmana i svjetla

5. ZAKLJUČAK

Za proizvodnju dovoljnog broja zdravih biljaka krumpira, npr. nakon primjene kulture meristema u svrhu oslobađanja biljaka od virusa, zdrave biljke je potrebno dalje *in vitro* razmnožiti. Razmnažati se mogu ili mikropropagacijom koja rezultira proizvodnjom zakorijenjenih biljaka *in vitro*, ili mikrotuberizacijom kojom se proizvode mali mikrogomolji u *in vitro* uvjetima.

Kvaliteta izdanaka dobivena mikropropagacijom ovisi o njihovoj visini, ali također i o dužini i razvijenosti korijena. Najveću visinu izdanaka u ovom istraživanju imali su izdanci razvijeni na tretmanu GA3+NAA, ali to nije povoljno za aklimatizaciju. Najmanju visinu i najmanji broj nodija imali su izdanci na tretmanu GA3+BAP.

Najduži i najrazgranatiji korijen razvili su izdanci na HFM tretmanu na kojem je zakorijenilo 97,8 % izdanaka. Nešto kraći korijen, ali 100 % uspjeh zakorijenjivanja imali su izdanci na GA3.

Obzirom na kvalitetu izdanaka, razvijenost korijena i postotak zakorijenjivanja, biljke s tretmana HFM i GA3 vjerojatno bi postigle najbolju stopu preživljavanja nakon prijenosa u *in vitro* uvjete.

Tretman GA3+BAP se zbog loše kvalitete izdanaka i slabog razvoja korijena ne preporuča u mikropropagaciji tradicijskog kultivara 'Brinjak'.

Iz pokusa mikrotuberizacije analizirana su četiri svojstva: postotak izdanaka s formiranim mikrogomoljima, prosječan broj mikrogomolja po izdanku, prosječna masa mikrogomolja po izdanku i prosječan promjer mikrogomolja.

Značajno veći postotak izdanaka s formiranim mikrogomoljima dobiven je u tretmanu KIN4 BAP1. Od kombiniranih učinaka tretmana i svjetla, najbolji se je za ovo svojstvo pokazao KIN4 BAP1 u mraku pri kojem je 88,6 % izdanaka formiralo mikrogomolje.

Broj mikrogomolja po izdanku nije se značajno razlikovao u ovisnosti o tretmanima.

Promjer i masa mikrogomolja bili su također značajno veći na tretmanu KIN4 BAP1, dok je svjetlo, kao glavni faktor značajno utjecalo samo na promjer mikrogomolja sa značajno boljim rezultatom kod kratkog dana.

Od kombiniranih učinaka tretmana i svjetla (interakcija), promjer mikrogomolja i masa mikrogomolja bili su značajno veći kod tretmana KIN4 BAP1 na kratkom danu.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su i mikropropagacija pojedinačnim nodijskim segmentima i mikrotuberizacija pogodni za *in vitro* razmnožavanje zdravih biljaka tradicijskog kultivara ‘Brinjak’.

6. POPIS LITERATURE

1. Azad, A. K., Khatun, Z., El-Jaoual Eaton, T., Hossen, I., Haque, K., Binod Soren, E. (2020). Generation of Virus Free Potato Plantlets through Meristem Culture and Their Field. U: American Journal od Plants Sciences. Vol 11. No. 11 https://doi.org/10.4236/ajps.2020.1111131 - pristup: 21.9.2021.
2. Dobránszki, J., Magyar-Tábori, K., Hudák, I. (2008). In vitro tuberization in hormone-free systems on solidified meium and dormancy od potato microtubers. U: Research centre, University of Debrecen Centre of Agricultural Sciencesn and Engineering. Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology. Global science book.
3. Hossain, S., Hossain, M., Haque, M., Haque M., Sarkar, D. (2017). Varietal evalution of potato microtuber and plantlet in seed tuber production. U: International journal of agronomy, Volume 2017, Article ID 7520297 https://doi.org/10.1155/2017/7520297 - pristup 23.6.2021.
4. Jurišić, M., Kanisek, J., Rapčan, I., Galić Subašić, D., Svat, E. (2016). Neki tehnološki čimbenici i ekonomski rezultati pri uzgoju sjemenskog krumpira. Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva, Vol. 78 No. 2 – 3, 2016. https://hrcak.srce.hr/175727 - pristup 1.7.2021.
5. Lešić, R., Borošić, J., Butorac, I., Herak-Ćustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2004). Povrćarstvo. Zrinski d.d. Čakovec
6. Li, J.-W., Chen, H.-Y., Li, J., Zhang, Z., Blystad, D.-R., Wang, Q.-C. (2018). Growth, microtuber production and physiological metabolism in virus-free and virus-infected potato in vitro plantlets grown under NaCl-induced salt stress. U: European Journal of Plant Pathology volume 152, pages417–432. https://doi.org/10.1007/s10658-018-1485-9 – pristup: 26.8.2021.
7. McMonagle, Connell i sur. (2020). Certified seed potato production. Agricultural science study guide. https://www.agriaware.ie/uploads/1/1/5/2/115230745/week_21__potato_production.pdf - pristup 23.06.2021.
8. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15: 473-497
9. Momena, K., Adeeba, R., Mehraj, H., Jamal Uddin. A.F.M., Islam, S., Rahman, L. (2014). In vitro microtuberization of potato (*Solanum Tuberosum L.*) cultivar through sucrose and growth regulator. U: Journal of Bioscience and Agriculture Research. Vol. 02 (02): 76-82, 2014 https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3610755 – pristup: 30.7.2021.
10. Nuwagira, F., Musaka, S.B., Wagire, W. W., Namugga, P., Kashaija, I. N., Barekye, A. (2015). Determination of hormonal combination for increased multiplication of tissue culture potato plantles. U: Uagnda Journal of Agricultural Sciences. 16 (1): 129 – 137. https://doi.org/10.4314/ujas.v16i1.11 - pristup: 22.09.2021
11. Pintarić, B. (2008). Mikropropagacija bijele topole (*Populus alba* L.). U: Šumarski list br. 7 – 8, CXXXII, str. 323-345.
12. Pospišil, A. (2010). Ratarstvo I. dio. Zrinski d.d. Čakovec
13. Pospišil, M., Pospišil, A., Šunjić, K., Solina, N., Brčić, M. & Papac, M. (2019). Može li se spasiti domaća proizvodnja sjemenskog krumpira?. U: Zbornik sažetaka 12. međunarodni kogres oplemenjivanja bilj, sjemenarstvo i rasadničartvo (Matotan Z. ur.), Hrvatsko agronomsko društvo, str. 76-78
14. Sahid, A., Khan, N., Nouroz, F., Erum, S., Nasim W. (2018). Effect of sucrose and growth regulators on the microtuberization of CIP potato (*Solanum tuberosum*) germplasm. U: Pakistan Journal of

Botany, Vol. 50(2): 763-768, 2018 https://inis.iaea.org/search/searchsinglerecord.aspx?recordsFor=SingleRecord&RN=49043177 – pristup: 30.7.2021.
15. Saker M. M., Moussa T. A. A, Heikal N. Z, Ellil A. H. A. A, Abdel-Rahman R. M. H. (2012). Selection of an efficient in vitro micropropagation and regeneration system for potato (Solanum tuberosum L.) cultivar Desiree. U: African Journal of Biotechnology 11: 16388-16404.
16. Sito, S., Džaja, V., Kušec, V., Ciler, K., Palinić, B., Glogovšek, T. (2015). Suvremena tehnika u proizvodnji krumpira. U: Glasnik zaštite bilja, Vol. 38 No. 5 https://hrcak.srce.hr/162362 - pristup 21.9.2021.
17. Vončina, D. (2013). Virusne bolesti krumpira. U: Glasilo biljne zaštite 4/2013. https://hrcak.srce.hr/file/249427 - pristup: 23.8.2021.

WEB izvori

1. Državni zavod za statistiku https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2020/SI-1655.pdf - 18.6.2021.
2. https://www.poslovni.hr/svijet/kina-najveci-svjetski-proizvoac-krumpira-2-22326 - pristup 30.6.2021.

7. POPIS SLIKA

Slika 4.3.1. Krumpir 3
Slika 2.5.1.1. Žućenje i uvijanje rubova listova prema gore kao posljedica zaraze PLRV 7
Slika 2.5.1.2. Zaostajanje u rastu kao posljedica zaraze PLRV 8
Slika 2.5.1.3. Potato virus Y 8
Slika 2.5.1.4. Simptomi PVX 9
Slika 4.1. Pupovi postavljeni u *in vitro* kulturu-početak rasta 16
Slika 4.1.1. Mikropropagacija na tretmanu GA3+NAA 18
Slika 4.1.2. Mikropropagacija na tretmanu GA3 18
Slika 4.1.3. Mikropropagacija na tretmanu GA3+BAP 19
Slika 4.1.4. Mikropropagacija na tretmanu HMF 19
Slika 4.3.2.1. Mikrotuberizacija na tretmanu KIN_4BAP_1+mrak i HFM-Mt+mrak 25
Slika 4.3.2.2. Mikrotuberizacija na tretmanu KIN_4BAP_1+KD i HMF-Mt+KD 25

8. POPIS TABLICA

Tablica 2.2.1. Sastav gomolja krumpira 4
Tablica 3.2.2.1. Tretmani (mediji) korišteni za mikropropagaciju 14
Tablica 3.2.3.1. Tretmani (mediji) korišteni za mikrotuberizaciju 14
Tablica 4.1.1. Značajnost efekta za uspješnost mikropropagacije 17
Tablica 4.1.2. Dužina izdanka i broj nodija po izdanku u ovisnosti o tretmanu 17
Tablica 4.2.1. Značajnost efekta za uspješnost zakorijenjivanja izdanaka i postotka zakorijenjivanja 20
Tablica 4.2.2. Postotak zakorijenjivanja i dužina korijena u ovisnosti o tretmanu 20
Tablica 4.3.1. Značajnost efekta za postotak izdanaka s mikrogomoljima i broj mikrogomolja po izdanku 21
Tablica 4.3.2. Značajnost efekta za promjer mikrogomolja i masu mikrogomolja 22
Tablica 4.3.1.1. Postotak izdanaka s mikrogomoljima u ovisnosti o tretmanu 22
Tablica 4.3.2.1. Promjer i masa mikrogomolja u ovisnosti o tretmanu 24
Tablica 4.3.2.2. Promjer i masa mikrogomolja u ovisnosti o svjetlu 24

9. POPIS GRAFOVA

Graf 4.3.1.1. Postotak izdanaka s mikrogomoljima 23
Graf 4.3.1.2. Broj mikrogomolja po izdanku 23
Graf 4.3.2.1. Promjer mikrogomolja u ovisnosti o kombiniranom učinku tretmana i svjetla 26
Graf 4.3.2.2. Masa mikrogomolja u ovisnosti o kombiniranom učinku tretmana i svjetla 26

Životopis

Ana Kovač, rođena 25. srpnja 1993. u Zagrebu. Završena XII. gimnaziju u Zagrebu. Preddiplomski izvanredni studij na Visokom gospodarskom učilištu upisan je 2013. godine te paralelno radila u Kauflandu k.d. Sveučilišni studij na Agronomskom fakultetu upisan je 2018. godine. Kao redovan student nastavlja raditi u Kauflandu k.d. u kojem i danas radi na odjelu Voća i povrća. Napredno znanje programa Word, osnovno znanje Excela i engleskog jezika. Hobiji su čitanje knjiga raznih žanrova.