MINERALNI SASTAV PRESADNICA DIVLJE RUŽE UZGOJENE IN VITRO

Mazur, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:049805

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Matea Mazur, apsolvent

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

MINERALNI SASTAV PRESADNICA DIVLJE RUŽE UZGOJENE *IN VITRO*

Diplomski rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Matea Mazur, apsolvent

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

MINERALNI SASTAV PRESADNICA DIVLJE RUŽE UZGOJENE *IN VITRO*

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog

1. Prof.dr.sc. Jasenka Ćosić, predsjednik
2. Prof.dr.sc Nada Parađiković, mentor
3. Doc.dr.sc. Tomislav Vinković, član

Osijek, 2015.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Nadi Parađiković i znanstvenom novaku Moniki Tkalec na podršci tijekom studiranja i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Sadržaj

1. Uvod…… 1
1.1. Cilj istraživanja……... 3
2. Pregled literature……. 4
2.1. Kontaminacije hranjive podloge……. 14
3. Materijali i metode…….. 18
3.1. Određivanje koncentracije fosfora u uzorku biljne tvari…… 21
3.2. Određivanje koncentracije kalija, kalcija i magnezija u uzorku biljne tvari…..… 21
4. Rezultati…….. 22
5. Rasprava…….. 27
6. Zaključak……. 32
7. Popis literature…… 33
8. Sažetak…… 37
9. Summary……. 38
10. Popis slika……... 39
11. Popis tablica…… 40
Temeljna dokumentacijska kartica……. 41
Basic document card……... 42

1. Uvod

Divlja ili pasja ruža (*Rosa canina* L.) grmolika je biljka iz porodice *Rosaceae*. Drugi nazivi pod kojima je poznata jesu: šipak, divlji šipak, ščipak, šibek, šip, šipkovina, šipurika, šipurina, pasja drača, pasja roža i drugi. Divlje ruže su vrste koje samoniklo rastu u prirodi, rasprostranjene su od sjeverne polutke do tropskih planinskih područja, a najbolje rastu u područjima umjerene klime, Europi i dijelu Azije (Forenbacher, 1990.).

U svijetu je rasprostranjeno više od 100 vrsta divljih ruža, a danas se selekcijom stvaraju nove sorte i hibridi. Divlja ruža u Hrvatskoj najčešće raste po sunčanim rubovima šuma, živicama, na pašnjacima nizinskog i brdskog područja, među grmljem i uz ograde, a uspijeva i na kamenjarima te na raznim područjima i tipovima tla. Odgovara joj glinenasto do kamenito tlo, plodno i više alkalno, bogato vapnencima, a može se naći i do 1400 m nadmorske visine (Forenbacher, 1990.).

Prema bazi podataka *Flora Croatica* u Hrvatskoj se može naći oko 35 samoniklih vrsta divljih ruža, a neke od najzastupljenijih su: *Rosa agrestis* Savi., *Rosa arvensis* Huds., *Rosa canina* L, *Rosa galica* L., *Rosa rubiginosa* L., *Rosa rugosa* Thunb., *Rosa sempervirens* L.[1]

Divlja ruža značajna je u prirodnim staništima, hortikulturi i farmakologiji. U prirodi osigurava hranu i stanište za neke životinje dok se u hortikulturi koristi kao podloga za cijepljenje komercijalnih sorti ruža (Baktir i sur., 2005.), a može se i ciljano saditi za sprječavanje erozije tla jer je prilagodljiva različitim tlima i ekološkim uvjetima.

Osim toga koristi se i u cvjećarstvu jer odrezane grane, sa atraktivnim plodovima, mogu dugo stajati i izgledati svježe u cvjetnim aranžmanima, no najčešća uporaba je u ljekovite svrhe. Ljekovitost divlje ruže poznata je još od davnina, prvi zapisi se spominju za vrijeme starog vijeka, a ljekovita svojstva opisali su i grčki i rimski liječnici u 1.stoljeću poslije Krista (Baričević, 2010.).

[1] Flora Croatica database
http://hirc.botanic.hr/fcd/

Plod šipak sadrži značajan postotak voćnog šećera 22%, bjelančevina 3,6% i masti 0,7%. Posebno je bogat vitaminom C (1700 mg/100 g), zatim sadrži vitamine B1, B2, niacin (B3) i karotene (provitamin A), vitamin E, sadrži i minerale; kalij, kalcij, cink, magnezij, natrij, fosfor, željezo, bakar i cink (Demir i Ozcan, 2001.). Sjemenke sadrže 6,9–8,6% ulja (nezasićene masne kiseline), 6,9-8,6% proteina i 950 mg askorbinske kiseline. Nadalje, ima anti-upalna djelovanja (Larsen i sur., 2003.), te velika antioksidativna svojstva (Gao i sur., 2000.).

Bogatstvo vitaminom C šipak čini izuzetno ljekovitim jer vitamin C sudjeluje u različitim fiziološkim procesima u ljudskom organizmu, sudjeluje u fiksaciji Ca u kostima, ubrzava detoksikacijske procese u organizmu (razgradnja nitrata, amina, nikotina, kancerogenih tvari i teških metala) (Demir i Ozcan, 2001.), djeluje antistresno te sudjeluje u mnogim metaboličkim procesima: hidroksilaciji prolina i lizina u sintezi kolagena, u pretvorbi folne kiseline u tetrahidrofolat te u sintezi steroidnih hormona (Šindrak i sur., 2013.).

Osim što se koristi zbog svojih ljekovitih svojstava divlja ruža je našla mjesto i u suvremenoj florikulturi, a razmnožavanje kultiviranih vrsta ruže može se obaviti sjemenom, reznicama, kalemljenjem te u novije vrijeme i metodom *in vitro* (Uggla i Moartinsson, 2005.).

Kultura *in vitro* ili mikrorazmnožavanje je postupak multipliciranja kulture biljnih stanica, tkiva, organa i cijelih biljaka u sterilnim i kontroliranim uvjetima unutar specijaliziranih laboratorija. Sterilni i kontrolirani uvjeti omogućuju povoljne uvijete za rast i razvoj biljnih dijelova, a uključuju pravilnu opskrbu kulture hranjivim mikro i makro elementima, optimalni pH hranjive podloge, kontrolirane uvjete temperature, vlage, osvjetljenja i sterilno okruženje. Postoji više termina koji se koriste za mikrorazmnožavanje, a najtočniji i najpotpuniji bio bi *in vitro* kultura stanica, tkiva i organa (Leva i Rinaldi, 2012.).

Jedan od najranijih koraka prema kulturi tkiva učinio je Henri-Luis Duhamel du Manceau, 1756. godine, tijekom svojih istraživanja regeneracije biljnih tkiva kada je uočio formiranje kalusa – nediferencirane biljne stanice (Gautheret, 1934.).

Značajnost *in vitro* metode je u tome što se u kratkom vremenskom periodu proizvede mnoštvo sadnog materijala spremnog za tržište, biljke su zdrave i oslobođene od bolesti i virusa jer su uzgajane u kontroliranim i sterilnim uvjetima, a prednost je i u tome što se presadnice i sadni materijal može uzgajati tijekom cijele godine (Salekjalali i sur., 2011.).

Osnova ideje multipliciranja biljnih dijelova proizlazi iz činjenice da su pojedinačne biljne stanice totipotentne. Naime, mnoge biljne stanice su sposobne formirati bilo koji drugi tip stanica ili tkiva, koji su na kraju potrebni za regeneraciju cijele biljke. Pravilnom kombinacijom hranjivih tvari i regulatora rasta nediferencirane biljne stanice u kulturi mogu biti inducirane na formiranje različitih biljnih tkiva, uključujući i korijen, stabljiku i listove. Teoriju totipotentnosti 1837. postavili su njemački biolozi Schwann i Schleiden (Leva i Rinaldi, 2012.).

1.1. Cilj istraživanja

Ovaj diplomski rad bavi se problematikom uzgoja divlje ruže u laboratorijskim uvjetima u *in vitro* uzgoju, prikazom najpotrebnijih mikro i makro hranjiva, a krajnji cilj je istražiti utjecaj različitih koncentracija hormona u hranjivoj podlozi i trtmana biostimulatoromna mineralni sastav presadnica divlje ruže.

2. Pregled literature

Prvi pokušaji dobivanja *in vitro* kultura biljaka izveo je Haberlandt 1902. godine kultiviranjem jednosupnica, no istraživanje se pokazalo neuspješno zbog poteškoća u kultivaciji jednosupnica, ali je time postavio koncepte *in vitro* kulture biljnih tkiva.

Prvo uspješno istraživanje i time veliki doprinos razvoju *in vitro* kulture dao je White 1934. godine u pokusima na rajčici. U svojem pokusu White je izolirao vršak korijena rajčice i kultivirao ga u tekućem mediju koji sadržavao anorganske soli, ekstrakt kvasca i saharozu. Nakon ovog istraživanja uslijedila su mnoga slična istraživanja izoliranja korijena različitih biljnih vrsta. Kulture izoliranih korijena doprinijele su u pronalaženju i definiranju hranjivih podloga, djelovanje vitamina i ishrane neorganskim solima te ugljikohidratima (White, 1963.).

Nakon uspješnog izoliranja kulture korijena znanstvenici su intenzivno radili i na razvoju kulture tkiva. Gautheret (1934.) i Nobecourt (1939.) objavljuju radove o uzgoju kulture tkiva mrkve, te White rad o uzgoju tkiva duhana.

In vitro kultura razmnožavanja postaje jedna od vodećih tehnologija u različitim istraživanjima sa područja biotehnologije i biljnih znanosti, a sve više postaje vodeća metoda u razmnožavanju velikog broja tržišno-isplativih biljaka. Kultura tkiva je opće prihvaćen naziv za kultiviranje bilo kojeg dijela biljke u *in vitro* uvjetima. No on zapravo označava samo kulturu neorganiziranih nakupina stanica kalusnog tkiva.

Dio biljke koji izoliramo i uvodimo u kulturu naziva se eksplatant. Postoji mnogo različitih tipova kulture *in vitro* koje se imenuju prema organu ili tkivu koje se uvodi u kulturu, a to su kultura stanica, sjemena, meristema, protoplasta, kalusa, izdanka, embrija i organa. Nakon uvođenja eksplantata u kulturu razlikuju se dva tipa rasta organizirani ineorganizirani rast (Jelaska, 1994.).

Tip organiziranog rasta javlja kada se organizirani dijelovi biljke ili organa (vršni meristemi izdanka ili korijena, lisni zameci, mladi cvjetni pupovi i sitni plodovi) uvedu u kulturu gdje nastavljaju svoj razvitak pri čemu sačuvaju svoju prvobitnu strukturu (npr. kultura embrija, antera, meristema itd.).

S druge strane neorganizirani tip rasta predstavlja tkivo koje se stvara, a ne sadrži ni jednu prepoznatljivu strukturu iz biljnog organizma i ima samo ograničen broj različito diferenciranih, specijaliziranih stanica kakve raspoznajemo u biljnom organizmu (npr. kalusna kultura, kultura stanica u suspenziji, kultura pojedinačnih stanica, kultura protoplasta) (Jelaska, 1994.).

Cijeli proces mikropropagacije se može sažeti u osam faza: prikupljanje materijala za mikropropagaciju, površinska sterilizacija, obrada materijala, uvođenje u kulturu, umnožavanje (multiplikacija) izbojaka, izduživanje izdanaka, ožiljavanje, prijenos biljaka u supstrat (adaptacija).

Prikupljanje materijala za mikropropagaciju uključuje sve postupke prije početka kulture *in vitro*; pravilan postupak s početnim materijalom, njegovo čuvanje u zdravu stanju. Vršni se meristem preporučuje kao eksplantat jer pruža određenu sigurnost u odstranjivanju mikroorganizama, koji su izvor zaraze (Jelaska, 1994.).

Površinska sterilizacija je postupak mikropropagacije u svrhu uklanjanja mikroorganizama koji bi mogli prilikom uvođenja eksplatanta u kulturu kontaminirati hranjivu podlogu. Kao sredstvo za sterilizaciju mogu se koristiti neki od izbjeljivača koji sadrže 4-6% natrijevog hipoklorita. Emajlirane bočice u kojima se vrši sterilizacija također moraju biti sterilne te se prije korištenja stavljaju u autoklav. Površinska sterilizacija se vrši u laminaru (Jelaska, 1994.).

Uobičajena procedura sterilizacije eksplantanata uključuje površinsku sterilizaciju početnih eksplatanta sa 70%-tnim etanolom kroz 20-30 sekundi, a zatim sa 0,1% $HgCl_2$ kroz 5-7 minuta ispiranjem u sterilnoj destiliranoj vodi (Rout i sur., 1989).

Sterilizacija hranjive podloge se može vršiti na više načina: fizičkim uništavanjem mikroorganizama suhim vrućim zrakom, vrelom parom (autoklav) ili zračenjem (UV-svjetlom ili g -zračenjem), kemijskim uništavanjem mikroorganizama pomoću različitih preparata: etilen-klorid ($C_2H_4Cl_2$), natrijev hipoklorit (NaOCl), klorno vapno ($Ca(ClO)_2$), antibiotici, i 70%-tni etanol i dr., fizičkim odstranjivanjem mikroorganizama filtriranjem i/ili pranjem (Skirvin i sur., 1990.).

Sterilizirani materijal pincetom prenosimo na sterilnu površinu gdje se dalje priprema za uvođenje u kulturu. Kao sterilnu površinu obično koristimo autoklavirani papir, karton, staklene petrijeve zdjelice i slično. Ovisno o veličini eksplatanta ovisi i brzina razvoja, manjem eksplatantu potreban je duži period za razvoj, ali je smanjena mogućnost unošenja nekog onečišćenja (Jelaska, 1994.).

Ova faza pokriva sterilnu izolaciju meristema, vegetacijskog vrška, eksplantata i dr. Najvažnije u ovoj fazi uvođenja u kulturuje dobivanje sterilnog rasta eksplantata. Dio postavljenih kultura, ovisno o njihovoj uporabi i vrijednosti početnog genotipa, može se čuvati kao „majčinski blok“ i služiti za presadnice ili kao izvor klične plazme za buduću uporabu.

Nakon obrade i pripreme eksplatanata oni se uvode u kulturu. Eksplatanti se pažljivo prihvaćaju steriliziranom pincetom i prenose na hranjivu podlogu. Hranjiva podloga se priprema ranije te se preljeva u epruvete, tikvice i sl. Ova faza ima dva cilja, da se tijekom njenog trajanja otklone zaražene kulture te da se dalje upute samo one kulture koje napreduju u razvoju (Jelaska, 1994.).

Murashig i Skoog medij (MS) je jedan od najčešće korištenih hranjivih podloga za rast ruže u mikropropagaciji. MS je nastao kao produkt u istraživanju biljnih hranjiva i regulatora rasta dvojice znanstvenika Toshio M. i Folke K. Skooga 1962. godine, a MS kao hranjiva podloga u sebi sadrži sve potrebne makro i mikroelemente, vitamine, organske soli i optimalne je pH vrijednosti od 5,8 - 6.5.

Prema međunarodnoj udruzi za fiziologiju biljaka elementi koji se nalaze u koncentraciji većoj od 0,5 $mM.1^{-1}$ definirani su kao makroelementi, a oni potrebni u koncentraciji manjoj od 0,5 $mM.1^{-1}$ su mikroelementi (Fossard, 1976.).

Esencijalni elementi u biljkama i hranjivoj podlozi osim ugljika, vodika i kisika su i dušik, fosfor, kalij, kalcij, magnezij i sumpor. Hranjiva podloga trebala bi sadržavati najmanje 25-60 mM neorganskog dušika za zadovoljavajući rast biljnih stanica. Kalij je potreban za rast većine biljnih vrsta. Većina hranjivih otopina sadrži kalij u koncentraciji 20-30 mM. Optimalne koncentracije fosfora, magnezija, sumpora i kalcija kreću se između 1-3 mM ukoliko su ostali elementi za rast zadovoljeni (Torres, 1989).

Esencijalni mikroelementi za rast stanica i tkiva uključuju željezo, mangan, cink, bor, bakar, molibden. Najveći problem kod mikroelemenata je topljivost željeza. Kobalt i jod se mogu dodati nekim hranjivim otopinama, ali njihovo značenje za rast i razvoj još nije precizno utvrđeno. Također, mogu se koristiti natrij i klor iako postoje istraživanja da oni nisu esencijalni za rast. Bakar i kobalt se dodaju hranjivoj otopini u koncentracijama od 0.1 μM, željezo i molibden 1 μM, jod 5 μM, cink 5-30 μM, mangan 20-90 μM i bor 25-100 μM (Torres, 1989.).

Davies je (1980.) zaključio kako je standardna MS podloga jedna od najboljih podloga za rast te da je na njoj uočen najbrži porast izdanaka različitih kultivara ruže (Pati i sur., 2005.).

Glavni cilj umnožavanja (multiplikacije) izbojka je u povećanju broja izboja (eksplatanata), koji se multipliciraju u subkulturi dok ne postignemo željeni broj multipliciranih izboja. Za svaku biljnu vrstu nužno je prilagoditi hranidbenu podlogu odnosno definirati sastav hormona i njihovu međusobnu ravnotežu kako bi se potakao rast vršnog i aksilarnog meristema.

Regulatori rasta imaju značajnu ulogu u kulturi tkiva jer potiču izduživanje izdanka, tropizam i razvoj apikalnog meristema. Regulatori rasta podijeljeni su u sljedeće skupine: auksini, citokini, giberelnini, ABA i etilen. Omjer auksina i citokinina određuje tip i domet organogeneze (Skoog, 1957.).

Auxini, giberilini i citokinini imaju pretežno stimulativna, a apscizenska kiselina i etilen inhibitorna djelovanja.

Mjesto nastanka citokinina je vršni meristem korijena a mogu se stvarati u sjemenkama i plodovima ali su u njima slabo pokretljivi. Razgradnja citokinina odvija se pomoću specifičnog enzima koji djeluje kao oksidaza (citokinin oksidaza). Sintetski (umjetno) proizvedene citokinine oksidaza ne može razgraditi, te primjena takvih hormona ima dugotrajno djelovanje kao i u slučaju auksina.[2]

Glavna fiziološka uloga citokinina je da stimulira diobu stanica,stimuliraju dotok hranjivih materijala iz drugih dijelova biljke u listove, i spriječavju gubitak klorofila**.** Na taj način citokinini odgađaju starenje biljke. Citokinini stimuliraju povećanje stanica i na taj način djeluju na povećanju plastičnosti i rastezanja stanične membrane**.** Poticanje rasta adventnih pupoljaka jedno je od najvećih osobitosti citokinina**.**[2] Citokinini koji se najčešće koriste su BAP (6-benzil aminopurin), 2 iP (6-dimetilaminopurin), kinetin, zeatin i TDZ (Thidiazuron) (Schmitz, 1972.).

Najvažniji i najrašireniji predstavnik prirodnog auksina je Indol 3 octena kiselina (IAA). Mjesto nastanka auksina su mladi listovi. Auksini stimuliraju rast adventivnog korjenja (rizogeneza) i inhibiraju rast glavnog korjena, sudjeluju u izuduživanju stanica i njihovoj diferencijaciji, apikalnom stimuliranju cvjetanja, stimuliranju zametanja plodova bez sjemenki, fototropizmu i geotropizamu.[2] U auksine ubrajamo IBA (indol 3 maslačna kiselina), 2,4 D (Diklorfenoksi octena kiselina) i NAA (Naftil octene kiseline)
(Torres, 1989.).

[2]Gnojidba.info
http://www.gnojidba.info/

Mjesto nastanka giberelina su mladi listovi vršnog pupa, meristemi izdanka i korjena i sjemenke. Giberelini stimuliraju produženi rast internodija osobito kod patuljastih biljaka, pospješuju klijanje sjemena, prekid dormantnosti sjemenki i induelikcija klijanja**,** utječu na bolji razvoj plodova te stimuliraju partenokarpiju.[2] Giberelini se nalaze u više od dvadeset spojeva, od kojih je GA3 (Giberelinska kiselina) najčšće korišten (Vasil,1998.).

Abscizenska kiselinaje biljni hormon koji pretežno inhibira procese rasta**.** ABA-e se sintetizira u stanicama koje sadrže kloroplaste ili amiloplaste a put sinteze je vrlo sličan putu nastanka giberelina**.** Jedan od najbolje proučenih efekata ABA-e je utjecaj na zatvaranje stoma. Utječe naproduženje dormantnost pupova i sjemenki, inhibira cvjetanje biljaka u uvjetima kratkog dana, ubrzava otpadanje listova i plodova, potiče rast korijena i bolje usvajanje vode iz tla.[2]

U fazi multiplikacije koriste se hranjive podloge sa citokininima koji stimuliraju izduživanje pupoljaka na eksplantatu. Najčešće se koristi 6-benzil aminopurin (BAP), 6-furfuril-aminopurin (KIN), n6-(2-izopentenil) adenin (2iP) i zeatin. Uz BAP, za većinu dikotiledonih vrsta u podlogu se dodaju i auksini i to najčešće indol-3-maslačna kiselina (IBA) (Jelaska, 1994.).

Na Odjelu za biologiju Islamskog sveučilišta u Aharu (2011.), obavljeno je istraživanje utjecaja regulatora rasta (BAP, NAA, IBA i GA3) u mikropropagaciji izboja ruže (*Rosa hybrida cv. Baccara*). Mladi izboji i pupovi uzeti su iz polja, obavljena je površinska sterilizacija i preneseni su u kulturu na MS hranjive podloge sa različitim kombinacijama regulatora rasta; 6-benzil aminopurina (BAP), 1- Naftil octene kiseline (NAA), i Giberelinske kiseline (GA3).

Morteza i sur. (2011.) su iz pokusa zaključili kako BAP i NAA značajno utječu na broj zelenih listova, broj smeđih listova i na povećanje dužine izdanaka. Visok porast i veći postotak multiplikacije postignut je kod potpunih hranjivih podloga sa 1 mg/l BAP-a , bez dodavanja GA i NAA.

Jedno od novijih istraživanja koje opisuje utjecaj regulatora rasta i mikroelemenata u *in vitro* uvjetima obavljeno je 2012. na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku, a opisuje djelovanje biostimulatora na rast i razvoj divlje ruže (*Rosa canina* L.).

U prvom dijelu istraživanja biljke su uzgajane na dvije različite hranjive podloge. Prva varijanta hranjive podloge sadržavala je hormon BAP (6-benzil aminopurin) te hormon IBA (Indol-maslačna kiselina), dok je druga varijanta podloge sadržavala samo hormon BAP. Biljke uzgojene na hranjivim podlogama presađene su u supstrat i tretirane biostimulatorom Radifarm®.

Istraživanje ukazuje da primjena biostimulatora *in vivo* u proizvodnji presadnica divlje ruže poboljšava rast i razvoj korijena i nadzemnog dijela što je preduvjet brže adaptacije biljaka na stres uslijed presađivanja (Tkalec i sur., 2012.).

Moallem i sur. (2012.) godine su proučavali direktnu regeneraciju *Rosa Canine L.* (divlje ruže) u kulturi tkiva. Rezultati istraživanja pokazuju da submaksimalne dužine izboja zabilježene u MS mediju uz dodatak 1,5 mg/lGA_3+ 0,25mg/l BAP. Među različitim hormonima, korijen se optimalno razvio iz izdanaka u svim tretmanima koji su sadržavali 1 mg /lNaa+0,25mg /l BAP.

Pokusi su provedeni pomoću kompletnog slučajnog dizajna (engl. Complete Randomized Design - CRD), a rezultati su analizirani pomoću softvera MSTAT. Eksplanti su prikupljeni od 3 mjeseca starih sadnica divlje ruže. Lisni eksplanti površinsko su sterilizirani sa 70% etanolom kroz 40 sekundi, a zatim 10 minuta sa 2,5% natrij hipokloritom nakon čega je uslijedilo ispiranje tri puta sa destiliranom vodom.

U ovom eksperimentu utvrđivalo se djelovanje i koncentracije hormona na izboje divlje ruže. Izboji eksplantanata su preneseni na MS podlogu. Ovim pokusom Moallem i suradnici su istraživali broj, dužinu i postotak regeneracje izboja te broj dana potrebnih za indukciju kalusa u ovisnosti o količini dodanih hranjiva i hormona.

Korištenjem kombinacije 2 hormona (GA3 i BAP-a) uočeno je povećanje maksimalne duljine izbojaka u prosjeku od (4,733 ±0,15cm), broj izbojaka po eksplantatu bio je u prosjeku (6 ± 1), a najkraće potrebno vrijeme za porast izboja bilo je 7 dana i zabilježeno je u mediju koji sadrži 1,5 mg GA3+0,25mg/lBAP. Također povećanjem koncentracije GA3 od 0.5 do 1.5mg/L, uočeno je značajno povećanje dužine izboja i broja izboja divlje ruže.

Tijekom istraživanja mjerene su masa i dužina korijena te masa stabljike divlje ruže. Masa korijena divlje ruže značajno je veća (p=0, 01) kod hranjive podloge s hormonom BAP u odnosu na hranjivu podlogu koja je sadržavala oba biljna hormona.

Također, biljke tretirane biostimulatorom imale su statistički (p=0, 01) značajno veću masu korijena, 13, 96%, u odnosu na kontrolu.

Masa stabljike bila je pod značajnim utjecajem (p=0, 01) hranjive podloge sa hormonom BAP, dok je značajnost utjecaja tretmana s biostimulatorom u *in vivo* uvjetima izostala. Dužina korijena nije bila pod značajnim utjecajem ni hormona ni biostimulatora. Biostimulator na bazi arginina i asparagina pozitivno je utjecao na povećanu masu korijena (Moallem i sur., 2012.).

Faza izduživanja izdanka se preporuča kod nekih biljnih vrsta, a glavna svrha joj je izduživanje izdanaka kako bi bili dovoljno dugački za fazu ožiljavanja. Ukoliko su izdanci dovoljno dugački, već i na kraju faze multiplikacije, tada se ova faza preskače.

Na ožiljavanje idu izdanci koji nisu manji od 10 mm, odvajaja se svaki izdanak posebno i prenosi na podlogu za ožiljavanje. Podloge za ožiljavanje najčešće sadrže samo auksine i to obično IBA. Kod biljnih vrsta kod kojih se javlja stvaranje kalusa uslijed djelovanja auksina upotrebljavaju se podloge bez hormona. Ožiljavanja u prosjeku traje oko 4 tjedna, a dinamika rasta, pojava grananja korijena ovise o biljnoj vrsti kao i metodi i uvjetima ožiljavanja. U ovoj fazi se koriste različiti tipovi hranjivih podloga kojima se dodaju razne supstance kao kofaktor ožiljavanja ovisno o biljnoj vrsti (Jelaska, 1994.).

Salekjalali i sur. (2011.) u svojim istraživanjima izlažu da je veliki porast korijena u fazi ožiljavanja postignut u polovičnim hranjivim podlogama sa 2 mg/l indol maslačne kiseline (IBA) i to u 90% slučajeva. Presadnice su uspješno aklimatizirane u mješavini mineralnog perlita i treseta te presađene u staklenik nakon 4 tjedna.

Cilj njihovog istraživanja bilo je utvrđivanje utjecaja regulatora rasta (BAP, NAA i GA3) na rast i razvoj vršnih izdanaka, te utjecaj IBA-e na porast korijena, a krajnji cilj je bio stvoriti protokol za razmnožavanje i mikropropagaciju ruže. U nultoj fazi istraživanja svi eksplantanti su bili kultivirani na MS hranjivu podlogu sa svim mikro/makro elementima i vitaminima, bez regulatora rasta.

Prvi pokus proveden je na podlozi sa kombinacijom regulatora rasta NAA od 0, 0.005 i 0.01 mg/l, i BAP-a u koncentraciji od 0, 1, 2 i 3 mg/l. Nakon toga su u drugom pokusu izboji kultivirani na bolju hranjivu podlogu sa kombinacijom regulatora rasta BAP u koncentraciji od 0,1 i 2 mlg/l i GA3 u koncentraciji od 0 i 1 mg/l. Eksplantati su subkultivirani u svježi medij svaka 4 tjedna, a konačni izboji su prebačeni u medij za ožiljavanje. Treći pokus proveden je na dvije različite podloge, sa i bez IBA-e u koncentraciji 2 mg/l kako bi se ustvrdio porast korijena.

Svi pokusi izvedeni su u sterilnim uvjetima u laboratoriju i u klima komori sa stalnom temperaturom od 22ºC i fotoperiodom od 16 sati. Ukupno je provedeno 12 različitih tretmana za kombinaciju regulatora rasta NAA i BAP-a i 6 tretmana za kombinaciju GA3 i BAP-a. U svim pokusima praćen je broj zelenih i smeđih listova te broj postranih izboja. Svi pokusi provedeni su 2 puta po 9 ponavljanja, a statistički podaci obrađeni su putem GLM (engl. General linear model) te uspoređeni za postotak sigurnosti od 0,001 i 0,005 % (Salekjalali i sur., 2011.).

U fazi ožiljavanja biljčice se prenose iz posuda u kojima su bile kultivirane u zemlju i prilagođavaju se rastu u vanjskim uvjetima. Ožiljene biljke se prije sadnje najprije ispiru vodom kako bi se uklonili ostatci agara, a zatim se cijela biljčica potapa u otopini fungicida na bazi kaptana. Biljčice se obično prenose u plastenike ili staklenike, gdje se sade u kontejnere koji se zatim pokrivaju plastičnom folijom zbog očuvanja visoke vlažnosti zraka. Staklenici koji su opremljeni sustavom za fino orošavanje ili stvaranje maglice od vrlo sitnih kapljica, pogodni su za aklimatizaciju biljaka iz uvjeta *in vitro* u vanjske uvjete (Jelaska, 1994.).

2.1. Kontaminacije hranjive podloge

Do kontaminacije hranjive podloge može doći zbog nedjelotvornih metoda prilikom sterilizacije eksplatanata uzetih s biljke in vivo, određivanja zagađivača u biljnoj kulturi in vitro, rukovanja aseptičnim biljnim materijalom te sterilizacije posuda za kultiviranje,instrumenata i hranjive podloge (Jelaska, 1994.).

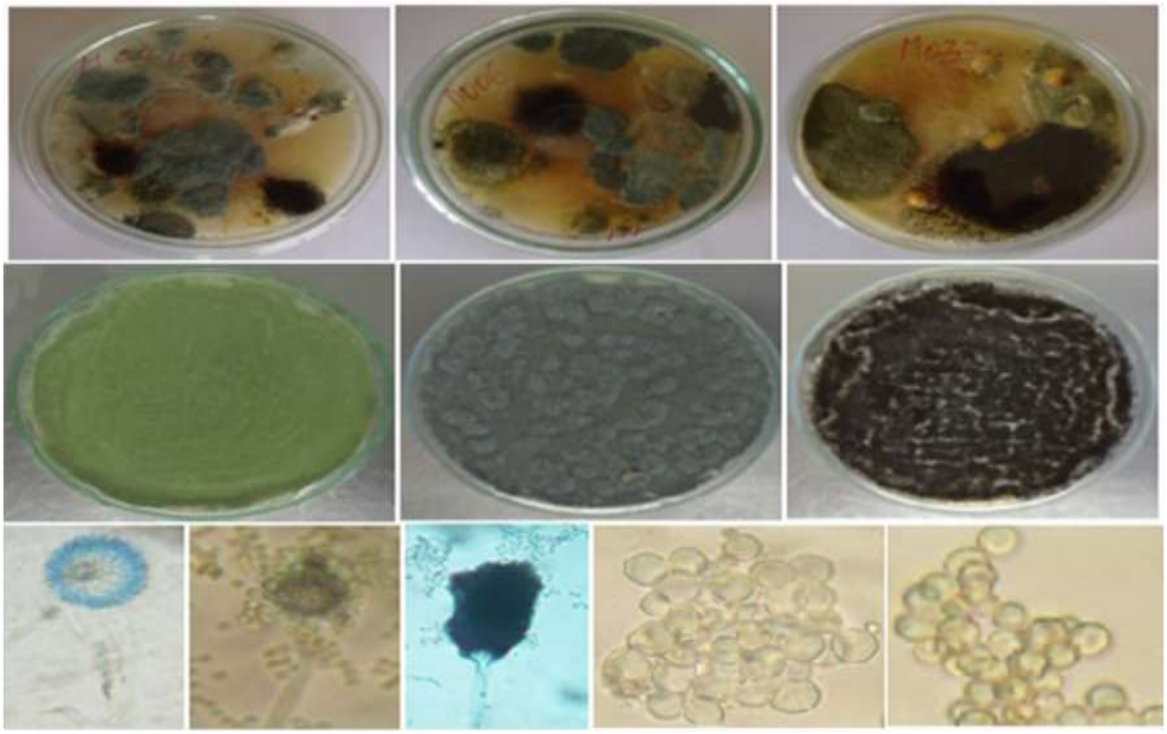
Vizualnom metodom obično se utvrđuju većina gljivica, kvasaca i mnoge bakterije na podlozi za biljnu kulturu. Međutim, određene bakterije ne stvaraju vidljive dokaze rasta na biljci ili podlozi te ih se opisuje kao latentni ili endogeni. (Fisse i sur., 1987., George i Sherrington, 1984., Leifert i sur., 1990.).

Kontaminacija pritajenim bakterijama može smanjiti umnožavanje izdanka u fazi multiplikacije, stopu zakorjenjivanja ili čak i potaknuti iznenadnu smrt cjelokupne kulture nakon mnogih supkultura (Leifert i sur., 1989.). *Corynebacterium sepedonicum* ili *Xanthomonas pellargonii* ostaju latentne i ne izazivaju simptome na biljci domaćinu in vitro.

Važni bakterijski rodovi koje su utvrdili i često izolirali razni istraživači kod različitih biljnih vrsta bili su: *Acinetobacter, Agrobacterium, Bacillus, Corynebacterium, Erwinia, Flavobacterium, Micrococcus, Pseudomonas, Staphylococcus i Xanthomonas* (Leifertu i sur., 1990.).

Najčešće izolirani kvasci kao onečušćivaći kulture biljnog tkiva su *Candida* i *Rhodotorula* (ružičasti kvasci), (Enjalric i sur., 1988.). Pripadaju skupini osmiofilnih kvasaca koji su visokotolerantni na šećer i sol pa dobro rastu na podlogama za kulturu tkiva.

Enjalric i sur. navode da su gljivice izolirane iz kulture biljnog tkiva bile *Neurospora, Aspergillus* (Slika 1), *Microsporium, Cladosporium i Philalophora* (Enjalric i sur., 1988.).

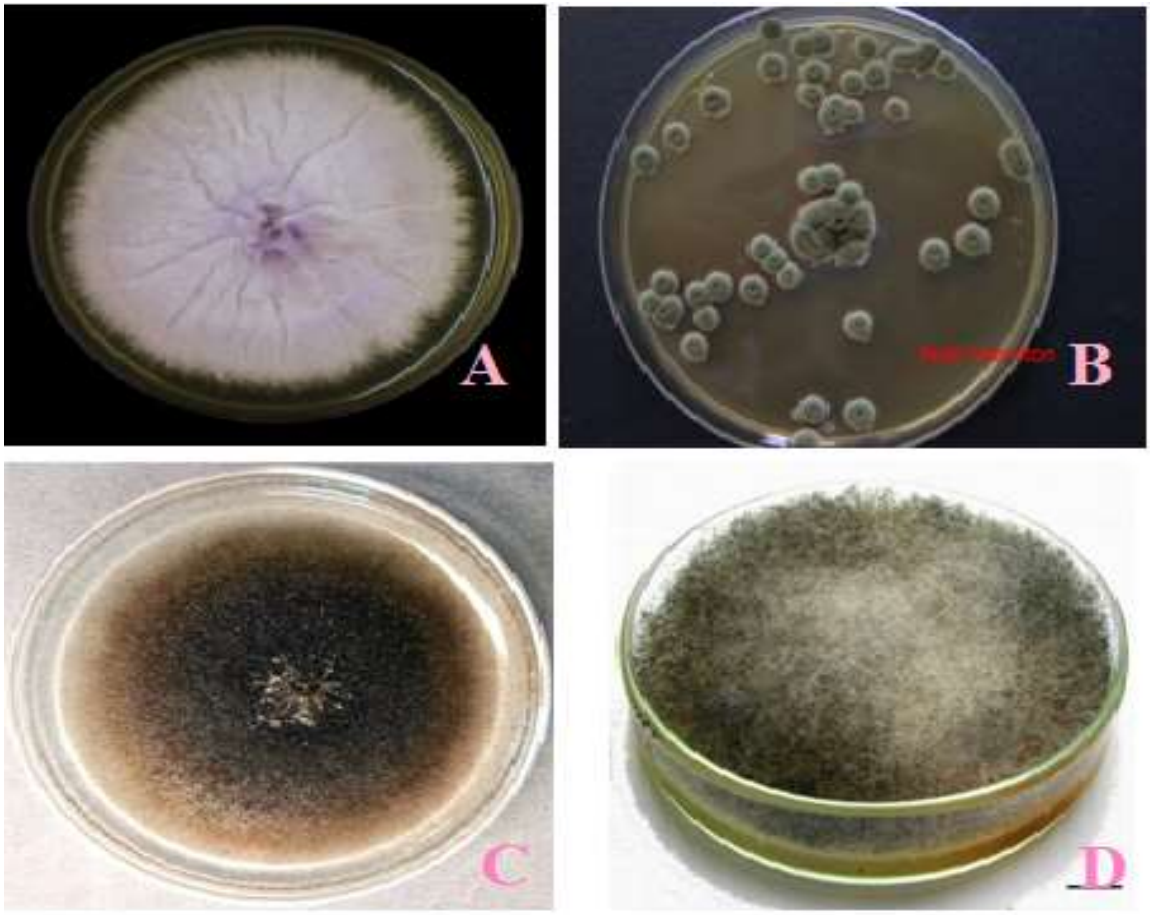


Slika 1: Kontaminacija hranjive podloge *Aspergillus sp*. (*izvor:* http://aws.labome.com)

Mikrobne kontaminacije su stalan problem koji često ugrožavaju razvoj kod *in vitro* uzgoja. U laboratorijima u sjeverno zapadnoj Nigeriji provedeno je istraživanje je cilj bio istražiti najčešće izvore kontaminacije u kulturi tkiva. Utvrdili su devetnaest uzročnika kontaminacije (jedanaest bakterija i osam gljivičnih uzročnika) povezanih s kulturom tkiva i uvjetima u laboratorijima.

Kao bakterijske uzročnike navode *Pseudomonas flourescens, Escherichia coli, Proteus sp, Micrococcus spp, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus subtillis, Corynebacterium sp i Erwinia sp.*

Pod gljivične uzročnike kontaminacije navode *Alternaria tenius, Aspergilus niger, Aspergilus fumigatus, Cladosporium sp, Saccharomyces sp, Fusarium oxysporum, Rizopus nigricans i Fusarium culmorum* (Odutayo i sur. 2007.). (Slika 2)



Slika 2: Kontaminacija hranjive podloge *Fusarium* sp. (A), *Cladosporium* sp. (B), *Alternaria* sp. (C), *Rizopus* sp. (D) (izvor: http://2.bp.blogspot.com, www.microscopy-uk.org, https://lh6.googleusercontent.com, www.studyblue.com)

S. aureus, B. cereus, B subtillis i *E coli.* zabilježeni su u više slučajeva kao kontaminanti sa ljudske kože, nego sa ostalih laboratorijskih sredstava korištenih u istraživanju. Većina uzročnika mikrobnih kontaminacija nalazi se u zidovima i stolovima laboratorija. Zrak u laboratoriju je povezan sa svim uzročnicima kontaminacija (Odutayo i sur. 2007.).

Također postoji opasnost onečišćenja kulture crvićima i kukcima. Iako nije često, ponekad se događa u proizvođačkim laboratorijima. Crvići ili kukci slobodno se kreću iz kulture u kulturu kroz otvore epruveta, te svojima putovanjem prenose mikrobne spore u kulture, a rezultat je onečišćenje koje uništava biljni materijal.

To mogu biti paukove ličinke koje su razmožene u invitro uvijetima manje i gotovo bezbojne, pa se sa sigurnošću mogu uočiti tek pod mikroskopom. Pojava resičara (*Thrips sp.*) u kulturi posebno je neugodna. Tripsi polažu jaja pod epidermu te jaja ostaju neoštečena nakon površinske sterilizacije biljnog materijala. Ondje se razvijaju sve do ličinki i krilatih pretkukuljica koje uzrokuju žućenje i sušenje vršaka i listova biljnih kultura u onečišćenim posudama (Jelaska, 1994.).

3. Materijali i metode rada

Istraživanje je provedeno u 2014. godini na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Pokus je postavljen u *in vitro* laboratorij u kontroliranim uvjetima.

Laboratoriji za kulturu tkiva sastoji se od tri osnovne komponente potrebne za rad. Radna površina na kojoj se vrše pripreme za početak rada kao što je pripravljanje podloge i sl., dio laboratorija u kojem se obavlja manipulacija biljnim materijalom u sterilnim uvjetima (laminar) te komora s kontroliranim uvjetima svjetla i temperature. Laboratorijska oprema korištena za provedbu pokusa: Erlenmeyerove tikvice, petrijeve zdjelice, pincete, hvataljka, nož, plamenik, stakleni štapić, laboratorijska vaga, autoklav. (Slika 3)



Slika 3: Parni sterilizator-autoklav (A) i prikaz ostale laboratorijske opreme korištene pri pripremi eksplatanta- pincete, petrijeve zdelice,nož,plamenik (B) (foto: Tkalec, M.)

Eksplatanti divlje ruže uvedeni su u kulturu na dvije varijante hranjive podloge. (Slika 5) Pokus se sastojao od dvadeset tikvica raspoređenih u četiri ponavljanja jedne varijante hranjive podloge (BI) i dvadeset tikvica druge varijante hranjive podloge (B). Prva varijanta hranjive podloga sadržavala je hormon BAP (6-benzil aminopurin) u koncentraciji 0,5 mg/l te hormon IBA (Indol-butilna kiselina) u koncentraciji 0,1 mg/l, dok je druga varijanta podloge sadržavala samo hormon BAP u koncentraciji 0,5 mg/l. Tikvice su se nalazile u komori u kontroliranim uvjetima na temperaturi 20°C te pod umjetnim osvjetljenjem šesnaest sati osvijetljenosti („dan“) i osam sati tame („noć“).



Slika 4: Eksplantanti divlje ruže presađeni na hranjivu podlogu (foto: Tkalec, M.)

Tijekom uzgoja na hranjivoj podlozi biljke divlje ruže su razvijale korijen (Slika 6) i lisnu masu te su nakon mjesec dana bile spremne za presađivanje u supstrat. Prilikom presađivanja biljke su se uranjale u 0,3% otopinu fungicida na bazi kaptanakako bi se osigurala otpornost na oboljenja nakon presađivanja.



Slika 5: Ožiljene biljke (foto: Tkalec, M.)

Presađivanje je obavljeno u kontejnere sa supstratom proizvođača Fruhstorfer Erde, Premium Blumenerde. Od pojedine varijante (BI i B) presađeno je po deset biljaka u četiri ponavljanja tretmana i četiri ponavljanja kontrole. Odmah nakon presađivanja te svaki slijedeći tjedan izvršen je tretman sa biostimulatorom Radifarm® u koncentraciji 0,25%.

Ovaj preparat spada u grupu biostimulatora koji sadrže glukozide (energetski faktori rasta) i aminokiseline (arginin i asparagin) koji stimuliraju razvoj korijena. Mjesec dana kasnije svaka biljka presađena je u vlastiti lončić gdje je nastavljen njen razvoj i tretman Radifarmom®.

Po završetku pokusa uzeti su uzorci biljne tvari pojedinih tretmana. Uzorkovana je cijela biljka te je odvojena nadzemna masa od korijena. Uzorci su označeni oznakama varijante te otpremljeni u laboratorij na sušenje u sušioniku na 70°C do konstantne mase, a potom usitnjeni do praškaste konzistencije. Analize biljne tvari na mineralni sastav obavljene su Laboratoriju za ishranu bilja na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku.

3.1. Određivanje koncentracije fosfora u uzorku biljne tvari

Osnovnaotopina uzorka biljne tvaridobivena oksidacijom korištena je također za određivanje koncentracije fosfora u uzorku. Kolorimetrijska fosformolibdenska metoda temeljena je na stvaranju kompleksa plave boje s amonijevim molibdatom, natrijevim sulfitom i hidrokinonom. Spektrofotometrijsko mjerenje intenziteta plave boje obavljeno je primjenom UV spektrofotometra Carry50 na valnoj duljini od 725 nm u odnosu na seriju standardnih otopina u rasponu koncentracija 0 do 6 μg P mL^{-1}. Koncentracija fosfora izražena je u % u suhoj tvari analizirane biljke (Vukadinović i Bertić, 1989.).

3.2. Određivanje koncentracije kalija, kalcija i magnezija u uzorku biljne tvari

Osnovna otopina uzorka dobivena razaranjem sa smjesom kiselina korištena je i za određivanje koncentracije kalija, kalcija i magnezija u uzorku biljne tvari. Koncentracije navedenih elemenata u osnovnojotopini određene su emisijskom (K) ili apsorpcijskom tehnikom (Ca i Mg) pomoću atomskog apsorpcionog spektrofotometra Perkin Elmer Analyst 200. Mjerenje koncentracije K, Ca i Mg u osnovnojotopini obavljeno je u odnosu na pripremljene serije standardnih otopina s poznatim koncentracijama koje su za K iznosile do 500 μg K mL^{-1}, za Ca do 200 μg Ca mL^{-1} i za Mg do 200 μg Mg mL^{-1}. Koncentracije K, Ca i Mg u % u suhoj tvari analizirane biljke utvrđene su računskim putem s obzirom na razrjeđenje osnovne otopine uzorka.

4. Rezultati

Ovim istraživanjem ispitivan je utjecaj različite koncentracije hormona u hranjivoj podlozite tretman biostimulatorom na mineralni sastav nadzemne mase i korijena presadnica divlje ruže. Različite koncentracije hormona nisu imale značajni utjecaj na koncentraciju P u nadzemnom dijelu presadnica ruže. Međutim, općenito su zabilježene veće koncentracije P kod presadnica kultiviranih na hranjivoj podlozi koja je sadržavala samo hormon BAP. Tretman biostimulatorom značajno (*P=0,01*) je utjecao na koncentraciju P u nadzemnoj dijelu presadnica divlje ruže (Tablica 1). Najveća utvrđena koncentracija P iznosila je 0,710% kod presadnica uzgajanih na hranjivoj podlozi sa hormonom BAP te tretiranih sa biostimulatorom.

Tablica 1. Koncentracija P (%) u nadzemnoj masi i korijenu presadnica divlje ruže pod utjecajem tretmana biostimulatorom te sastava hranjive podloge

Varijanta tretiranja (A)	Nadzemni dio			Korijen		
	Kontrola (B1)	Tretman (B2)	Prosjek	Kontrola (B1)	Tretman (B2)	Prosjek
BI* (A1)	0,563	0,596	0,580	0,359	0,411	0.385
B** (A2)	0,573	0,656	0,615	0,390	0,377	0.383
Prosjek	0,568	0,626		0,375	0,394	

Nadzemni dio			
LSD	Hranjiva podloga (A)	Biostimulator (B)	Interakcije A x B
0,01	ns	0,0482	Ns
0,05	ns	0,0318	Ns

Korijen			
LSD	Hranjiva podloga (A)	Biostimulator (B)	Interakcije A x B
0,01	ns	ns	Ns
0,05	ns	ns	Ns

* Hranjiva podloga sa hormonima BAP (6-benzil aminopurin) i IBA (Indol-butilna kiselina)
** Hranjiva podloga sa hormonomBAP (6-benzil aminopurin)
ns = nije signifikantno

Koncentracija P u korijenu presadnica divlje ruže nije bila pod značajnim utjecajem niti hranjive podloge niti tretmana s biostimulatorom. Međutim, zabilježena je značajno veća vrijednosti koncentracije fosfora (*P=0,05*) kod tretmana biostimulatorom presadnica kultiviranih na hranjivoj podlozi sa hormonima BAP i IBA u odnosu na njihovu kontrolu. Upravo kod te varijante je i utvrđena najveća koncentracija P u korijenu presadnica divlje ruže koja je iznosila 0,442%.

Različite koncentracije hormona u hranjivoj podlozi nisu imali statistički značajni utjecaj na sadržaj K u nadzemnom dijelu presadnica divlje ruže.Nešto većisadržaj K je utvrđen kod presadnica kultiviranih na hranjivoj podlozi sa hormonima BAP i IBA koje su služile kao kontrola u odnosu na kontrolu presadnica koje su bile kultivirane na hranjivoj podlozi sa samo hormonom BAP. (Tablica 2)

Tablica 2. Sadržaj K (g kg^{-1}) u nadzemnomdijelui korijenu presadnica divlje ruže pod utjecajem tretmana biostimulatorom te sastava hranjive podloge

Varijanta tretiranja (A)	Nadzemnidio			Korijen		
	Kontrola (B1)	Tretman (B2)	Prosjek	Kontrola (B1)	Tretman (B2)	Prosjek
BI* (A1)	24,920	27,430	26,175	17,285	26,753	22,019
B** (A2)	24,515	27,498	26,007	23,482	27,888	25,685
Prosjek	24,717	27,464		20,384	27,320	

Nadzemni dio			
LSD	Hranjiva podloga (A)	Biostimulator (B)	Interakcije A x B
0,01	ns	1,0175	Ns
0,05	ns	1,5414	Ns

Korijen			
LSD	Hranjiva podloga (A)	Biostimulator (B)	Interakcije A x B
0,01	1,6121	1,5650	2,0592
0,05	0,8782	1,6121	1,2995

* Hranjiva podloga sa hormonima BAP (6-benzil aminopurin) i IBA (Indol-butilna kiselina)
** Hranjiva podloga sa hormonomBAP (6-benzil aminopurin)
ns = nije signifikantno

Što se tiče tretmana sa biostimulatorom značajno većisadržaj K (*P=0,01*) je utvrđen u nadzemnom dijelu presadnica divlje ruže kod tretiranih biljaka u odnosu na kontrolu. Najveći zabilježenisadržaj K utvrđen je kod presadnica uzgajanih na hranjivoj podlozi sa hormonom BAP te tretiranih sa biostimulatorom i iznosila je 27. 552 g kg^{-1} K.

Sadržaj K u korijenu presadnica divlje ruže bila je pod značajnim utjecajem različite koncentracije hormona u podlozi (*P=0,01*) kao i tretmana biostimulatorom (*P=0,01*). Utvrđeni je većisadržaj K u korijenu kod presadnica kultiviranih na hranjivoj podlozi sa samo hormonom BAP u odnosu na presadnice kultivirane na hranjivu podlogu koja je sadržavala hormone BAP i IBA. Najveći utvrđenisadržaj K između kontrolnih varijanta iznosio je 23.72 g kg^{-1} K, dok je općenito najveći zabilježenisadržaj utvrđen kod biljaka tretiranih s biostimulatorom i iznosio je 28.370 g kg^{-1} K (Tablica 2).

Različite koncentracije hormona u hranjivoj podlozi nisu značajno utjecale na sadržaj Ca u nadzemnom dijelu presadnice divlje ruže kao ni u korijenu. Također, tretman s biostimulatorom nije utjecao na sadržaj Ca kod presadnice divlje ruže. Najveći sadržaj Ca u nadzemnom dijelu presadnica iznosio je 6,833g kg^{-1}Ca i utvrđen je kod presadnica tretiranih sa biostimulatorom, a kultiviranih na hranjivoj podlozi sa samo hormonom BAP (Tablica 3). Najmanji utvrđenisadržaj Ca iznosio je 5.763 g kg^{-1} Ca i zabilježen je kod presadnica divlje ruže koje se pripadale kontroli i također kultiviranena hranjivoj podlozi sa samo hormonom BAP.

Kod korijena divlje ruže najveći sadržaj Ca utvrđen je kod presadnicatretiranih sa biostimulatorom, a kultiviranih na hranjivoj podlozi sa samo hormonom BAP i iznosi je 6.081 g kg^{-1} Ca. Suprotno tome, najmanji sadržaj Ca utvrđen je kod presadnicatretiranih sa biostimulatorom, a kultiviranih na hranjivoj podlozi sa hormonima BAP i IBA i iznosio je 4,512 g kg^{-1} Ca.

Tablica 3. Sadržaj Ca (g kg^{-1}) u nadzemnom dijelu i korijenu presadnica divlje ruže pod utjecajem tretmana biostimulatorom te sastava hranjive podloge

Varijanta tretiranja (A)	Nadzemnidio			Korijen		
	Kontrola (B1)	Tretman (B2)	Prosjek	Kontrola (B1)	Tretman (B2)	Prosjek
BI* (A1)	6,386	6,276	6,331	5,479	5,079	5,279
B** (A2)	6,317	6,556	6,436	5,350	5,548	5,449
Prosjek	6,351	6,416		5,414	5,314	

Nadzemnidio			
LSD	Hranjiva podloga (A)	Biostimulator (B)	Interakcije A x B
0,01	ns	ns	Ns
0,05	ns	ns	Ns

Korijen			
LSD	Hranjiva podloga (A)	Biostimulator (B)	Interakcije A x B
0,01	ns	ns	Ns
0,05	ns	ns	Ns

* Hranjiva podloga sa hormonima BAP (6-benzil aminopurin) i IBA (Indol-butilna kiselina)
** Hranjiva podloga sa hormonomBAP (6-benzil aminopurin)
ns = nije signifikantno

Sadržaj Mg u nadzemnom dijelu presadnica divlje ruženije bio pod značajnim utjecajem niti hranjive podloge niti tretmana s biostimulatorom. Veći sadržaj Mg zabilježen je kod biljaka kultiviranih na hranjivoj podlozi sa hormonom BAP u odnosu na biljke kultivirane na hranjivoj podlozi sa oba hormona.

S aspekta tretmana s biostimulatorom veći sadržaj Mg zabilježen je kod kontrolnih biljaka. Najveći sadržaj Mg utvrđen je kod kontrolnih presadnica koje su bile kultivirane na hranjivoj podlozi sa samo BAP hormonom i iznosio je 3,285 g kg^{-1} Mg, a najmanji sadržaj koji je iznosi 2,601 g kg^{-1} Mg kod presadnica tretiranih biostimulatorom, a kultiviranih na hranjivoj podlozi sa hormonima BAP i IBA.

Različite koncentracije hormona u hranjivoj podlozi nisu značajno utjecale na sadržaj Mg u u korijenupresadnice divlje ruže. Također, tretmana s biostimulatorom nije utjecao na sadržaj Mg u korijenu presadnice divlje ruže. Najveći sadržaj Mg u korijenu presadnica iznosio je 2,988g kg^{-1}Mg i utvrđen je kod kontrolnih presadnica koje su bile kultivirane na hranjivoj podlozi sa hormonima BAP i IBA (Tablica 4). Najmanja utvrđena koncentracija Mgu korijenu iznosila je 2,563g kg^{-1}Mg i zabilježena je kod presadnica divlje ruže tretiranih biostimulatorom i kultiviranena hranjivoj podlozi sa samo hormonom BAP.

Tablica 4. Sadržaj Mg (g kg^{-1}) u nadzemnom dijelu i korijenu presadnica divlje ruže pod utjecajem tretmana biostimulatorom te sastava hranjive podloge

Varijanta tretiranja (A)	Nadzemni dio			Korijen		
	Kontrola (B1)	Tretman (B2)	Prosjek	Kontrola (B1)	Tretman (B2)	Prosjek
BI* (A1)	2,803	2,784	2,793	2,761	2,828	2,794
B** (A2)	2,990	2,882	2,936	2,724	2,639	2,681
Prosjek	2,896	2,833		2,742	2,734	

Nadzemni dio			
LSD	Hranjiva podloga (A)	Biostimulator (B)	Interakcije A x B
0,01	ns	ns	Ns
0,05	ns	ns	Ns

Korijen			
LSD	Hranjiva podloga (A)	Biostimulator (B)	Interakcije A x B
0,01	ns	ns	Ns
0,05	ns	ns	Ns

* Hranjiva podloga sa hormonima BAP (6-benzil aminopurin) i IBA (Indol-butilna kiselina)
** Hranjiva podloga sa hormonomBAP (6-benzil aminopurin)
ns = nije signifikantno

5. Rasprava

Divlja ruža kao samonikla biljka u svom prirodnom staništu ima visoku upotrebnu vrijednost, zbog koje se i javila potreba za njenom kultivacijom koja ju je svrstala u vrh naj cjenjenih biljaka. Svojim grmolikim oblikom te mnoštvom blijedo ružičastih cvjetova doprinijeti će dekorativnosti svakog vrta, a poslužiti će i kao prirodna barijera te na padinama spriječiti eroziju tla.

Međutim, ljekovita svojstava i upotreba u kozmetičkoj industriji najzaslužniji su za brojne plantaže divlje ruže diljem svijeta. Tako npr. korijen *R. brunonii*se koristi u liječenju očnih bolesti (Kaul i sur.,1999.), a vodeni ekstrakt *Rosa damascena*zbog visokog sadržaja flavonoida pokazao je i antiHIV djelovanje (Mahmood i sur., 1996.). Komercijalnu značajnost uvelike povećava i ružino ulje visoke kvalitete koje zbog utroška znatne količine biljnog materijala postiže visoku cijenu (Frederick i sur., 2002.).

Nadalje, poznato je kako se kultivirane vrste ruže uzgajaju cijepljenjem na podloge divlje ruže s obzirom da one odlikuju većom otpornošću na niske temperature i bolesti te boljom prilagodbom teškim tlima uslijed razvijanja bujnijeg korijenovog sustava (Hessayon, 2001.).

Upravo korijenov sustav ima jednu od glavnih uloga u životu biljke držeći je ju čvrsto na tlu, upijajući vodu i hranjive tvari te ih translociraju u biljku. U današnje vrijeme kada je sve veća potražnja ruža sami time su i veći zahtjevi prema odgovarajućim podlogama za cijepljenje kultiviranih ruža.

Stoga, se opravdano pribjegava novim načina brzog umnožavanja biljnog materijala kao što je mikrorazmnožavanje. Uspješnost uzgoja divlje ruže u kulturi tkiva su prezentirali mnogi istraživači (Gheorghiţă i sur., 2012.; Shirdel i sur., 2012.; Pawłowska, B., 2011.; Moallem i sur., 2012.).

U ovom istraživanju kultivirana je divlja ruža (*Rosa canina* L.) *in vitro* na dvije hranjive podloge različitih koncentracija biljnih hormona te je provedena adaptacija istih biljaka u supstratu uz primjenu biostimulatora Radifarm®.

Biostimulatori korišten u ovom istraživanju sadrži aminokiseline i huminske kiseline za koje je poznato da utječu na poboljšan rast i razvoj biljaka (García, 2006., Thi Lua i Bőhme, 2001.) te sepretpostavlja da je pozitivno djelovanje biostimulatora i rezultat prilagođavanja ili promjene određenih fizioloških procesa na koje djeluju spomenute tvari.

U ovom istraživanju niti različita koncentracija hormona u hranjivoj podlozi niti tretman biostimulatorom nisu značajno utjecali na koncentraciju P u korijenu presadnica divlje ruže. Biljke usvajaju P u anionskom obliku kao $H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-}.

Koncentracija P u biljkama je 0,3 – 0,5 %. Najveće potrebe za fosforom su za intenzivan razvoj korijenovog sustava i u razdoblju prelaza iz vegetativne u generativnu fazu (Vukadinović i Lončarić, 1997.).

Najmanja prosječna koncentracija P od 0,359 % utvrđena je kod korijena presadnica divlje ruže koje su pripadale kontroli, a kultivirane na podlozi sa hormonima BAP i IBA. Najveća prosječna koncentracija P iznosila je 0,411 % i utvrđena je kod presadnica divlje ruže tretiranih biostimulatorom, a kultiviranih također na hranjivoj podlozi sa oba hormona.

Prema tome, koncentracija P u korijenu presadnice divlje ruže je u normalnim granicama. Slične rezultate su u svom istraživanju prikazali Zeljković i sur. (2013.), gdje je utvrđena koncentracija P u korijenu begonije (*Begonia semperflorens*Link. et Otto) te kadifice (*Tagetes patula* L.). nije bila pod značajnim utjecajem tretmana biostimulatorom.

U nadzemnom dijelu utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji fosfora u korijenu presadnica divlje ruže tretiranih s biostimulatorom u odnosu na netretirane presadnice.Koncentracija P kod presadnica tretiranih biostimulatorom bila je za 10,21% veća u odnosu na kontrolu.

Intenzivnije usvajanje pojedinih makroelemenata, u fazi presadnica, može biti objašnjeno time što primijenjeni biostimulator Radifarm u svom sastavu sadrži izvjesne količine huminskih kiselina koje povećavaju usvajanje hranjivih elemenata i njihov transport u biljci (Adani i sur., 1998.).

U ranijim istraživanjima potvrđeno je da arginin indirektno stimulira rast korijena soje, rast lateralnog korijena kod rajčice i adventivnog korijena kod krastavca (Flores i sur., 2008.).

Sadržaj K u nadzemnom dijelu presadnica divlje ruže bio je pod značajnim utjecajem tretmana biostimulatorom. Varijante tretmana biostimulatorom su u prosjeku svaka imale prosječno utvrđenisadržaj K oko 27.400 g kg^{-1} K dok je utvrđenisadržaj K u kontrolnim varijantama iznosio prosječno 24.600 g kg^{-1}K. Biljke vrlo intenzivno usvajaju kalij posebno u najranijim fazama rasta i razvoja.

Kao i dušik, kalij biljke mogu usvajati preko lista, te zbog njegove lake pokretljivosti u svim pravcima folijarna prihrana K je preporučljiva. K se u najvećoj mjeri akumulira u najmlađim organima gdje je intenzivna dioba stanica, pa se zbog toga često naziva i "elementom mladosti". Značajan je za visinu prinosa i kvalitetu plodova. Utječe na formiranje šećera, bolju obojenost ploda, veći sadržaj suhe tvari, bolje čuvanje (Kastori, 2006).

U ovom istraživanju sadržaj K u korijenu presadnica divlje ruže bio je pod značajnim utjecajem i tretmana biostimulatorom i različitih koncentracija hormona u hranjivoj podlozi. Prosječno najveći sadržaj K utvrđen je kod presadnica tretiranih biostimulatorom te kultiviranih na hranjivoj podlozi sa hormonom BAP te je iznosio 27.888 g kg^{-1} K. Najmanji prosječan sadržaj K od 17.285 g kg^{-1} K utvrđen je kod korijena presadnica divlje ruže koje su pripadale kontroli, a kultivirane na podlozi sa hormonima BAP i IBA.

Tretman biostimulatorom kao i različite koncentracije hormona u hranjivoj podlozi nisu utjecale na sadržaj Ca u nadzemnom dijelu presadnica divlje ruže. Prosječne utvrđene vrijednosti Ca u nadzemnom dijelu presadnica divlje ruže u ovisnosti o različitoj koncentraciji hormona bile su veće kod hranjive podloge sa hormonom BAP (6,436 g kg^{-1} Ca) u odnosu na hranjivu podlogu sa hormonima BAP i IBA (6,331 g kg^{-1} Ca).

Promatrajući prosječni sadržaj Ca u nadzemnom dijelu presadnica divlje ruže u ovisnosti o tretmanu biostimulatorom utvrđeni je veći sadržaj Ca kod tretiranih biljaka (6,416 g kg^{-1} Ca) u odnosu na kontrolu (6,351 g kg^{-1} Ca).

Biljke kalcij usvajaju u vidu Ca^{2+} iona i smatra se da je usvajanje kalcija manje-više pasivan proces. Antagonisti pri usvajanju Ca su Mg i K. Najviše ga ima u listovima, stabljici i korijenu, a najmanje u plodu (Kastori, 2006.).

Kalcij se pretežno usvaja aktivnom zonom korijena, ali ima i mišljenja da je usvajanje kalcija meristemskim stanicama pasivan proces, a starijim, vakuoliziranim stanicama, aktivan. Koncentracija kalcija u biljkama prosječno je oko 0,5% u ST (0,1 do > 5%) (Vukadinović i Lončarić, 1997.).

Također, sadržaj Ca u korijenu presadnica divlje ruže nije bio pod značajnim utjecajem tretmana biostimulatorom i različite koncentracije hormona u hranjivoj podlozi. Prosječne utvrđene vrijednosti Ca u korijenu presadnica divlje ruže u ovisnosti o različitoj koncentraciji hormona bile su veće kod hranjive podloge sa hormonom BAP (5,449 g kg^{-1} Ca) u odnosu na hranjivu podlogu sa hormonima BAP i IBA (5,279 g kg^{-1} Ca).

Dok u ovisnosti o tretmanu s biostimulatorom prosječne utvrđene vrijednosti Ca u korijenu presadnica divlje ruže bile su veće kod kontrolnih biljaka (5,414 g kg^{-1} Ca) nego kod tretiranih biostimulatorom (5,279 g kg^{-1} Ca). Sadržaj kalcija u lišću biljaka je veći u odnosu na korijen, a starije lišće je bogatije od mlađeg.

To ukazuje na teško premještanje kalcija u biljkama (iz fiziološki starih u mlađe, aktivnije dijelove), a reutalizacija (ponovo korištenje) je vjerojatno moguća samo iz korijena i stabla, ali ne i iz starijeg lišća gdje je i najviše kalcija (Vukadinović i Lončarić, 1997.).

Tretman biostimulatorom se pokazao korisnim u sprječavanju nastanka vršne truleži ploda paprike djelujući na poboljšano usvajanje Ca (Parađiković i sur., 2011., 2013.).

Magneziji je sastavni dio organske tvari, važan je za sintezu pigmenata karotena i ksantofila, te posebno značenje ima u procesu fotosinteze. Biljke usvajaju Mg u ionskom obliku kao Mg^{2+}. Stvarajući Mg-pektinat sudjeluje u izgradnji membrane i sa ostalim kationima utječe na regulaciju vodnog režima u biljci. Sadržaj Mg u biljkama je prosječno 0,1 – 1,0 % u suhoj tvari, a dobro su opskrbljene biljke s 0,15 – 0,35 % (Parađiković, 2009.).

U ovom istraživanju sadržaj magnezija u nadzemnom dijelu i korijenu presadnica divlje ruže nije bio pod značajnim utjecajem različite koncentracije hormona ni tretmana biostimulatorom. U ovisnosti o različitoj koncentraciji hormonaprosječne utvrđene vrijednosti Cau nadzemnom dijelu presadnica divlje ružebile su veće kod hranjive podloge sa hormonomsa hormonom BAP (2,936 g kg^{-1} Mg) u odnosu na hranjivu podlogu sa hormonima BAP i IBA (2,793 g kg^{-1} Mg).

Dok u ovisnosti o tretmanu s biostimulatorom prosječne utvrđene vrijednosti Ca u nadzemnom dijelu presadnica divlje ruže bile su veće kod kontrolnih biljaka (2,896 g kg^{-1} Mg) nego kod tretiranih biostimulatorom (2,833 g kg^{-1} Mg).

Klorofil je jedini organski spoj čiji je magnezij konstitucijski element i više ga ima u mladom lišću koje raste. Usvajanje magnezija je aktivan proces, uglavnom ograničen na aktivnu zonu korijena (Vukadinović i Lončarić, 1997.).Biljke magnezij usvajaju u vidu Mg^{2+}iona. Za razliku od Ca, magnezij se relativno dobro kreće kroz floem.

Antagonisti pri usvajanju Mg su Ca, Mn, K, H i NH_4^+ ioni. Znatno više magnezija ima u plodovima, nego u listovima i stabljici (Kastori, 2006.).U ovom istraživanju prosječni sadržaj magnezija u korijenu presadnice divlje ruže iznosio je 2,737 g kg^{-1} Mg svi ispitivanih varijanti.

6. Zaključak

Primjena biostimulatora i otopina na bazi organske tvari biljnog porijekla, uklapa se u program organske poljoprivredne proizvodnje neškodljive okolini i ljudima, ali i kao dopuna proizvodne tehnologije u konvencionalnoj poljoprivredi. U ovom istraživanju pozitivno je utjecala na usvajanje hranjivih elemenata posebice P i K u nadzemnom dijelu te K u korijenu presadnica divlje ruže. Upravo ova dva neophodna elementa su uz N biljkama u najvećim količinama i potrebna za postizanje dobre kvalitete i visokih prinosa cvjetova. Na kraju, primjena biostimulatori osigurava adaptaciju *in vitro* biljaka u supstratu, a utječe i na razvoj jakog korijenovog vrata te razvijenog habitusa korijenove mreže presadnica divlje ruže kao preduvjeta za uspješno nacjepljivanje kultiviranih ruža.

7. Popis literature

1. Adani F., Genevini P., Zaccheo P., Zocchi G. (l998): The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. Journal of Plant Nutrition 21: 561-575.
2. Baričević L., Kakvoća plodova sjemenjaka pasje ruže (*Rosa canina* L.), Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 2010.
3. Baktir I., Hazar D., Uysal S. i Ozel S. (2005.): Possible Uses of Dogrose Branches and Rose Hips for Ornamental Purposes, ISHS, 690.
4. Demir F., Ozcan M. (2001.): Chemical and technological properties of rose (*Rosa canina* L.) fruits grown wild in Turkey,Journal of Food Engineering 47:333-336.
5. Enjalric F., Carron MP., Lardel L., (1988.): Contamination of primary cultures in tropical areas, the case of *Hevea brasiliensis,* Acta Hort 225:57-65.
6. Fisse J., Batlle A., Pera J., (1987.): Endogenous bacteria elimination in ornamental explants. Acta Hortic 212:87,90.
7. Flores T., Todd C.D., Tovar - Mendez A., Dhanoa P.K., Correa – Aragunde N., Hoyos M.E., Brownfield D.M., Mullen R.T., Lamattina L., Polacco J.C. (2008): Arginase -negative mutants of arabidopsis exhibit increased nitric oxide signaling in root development. Plant Physiology 147: 1936-1946.
8. Forenbacher S. (1990.): Velebit i njegov biljni svijet, Zagreb
9. Fossard R. (1976.): Tissue culture for plant propagation. Armidale: University of New England.
10. Frederick C., Wagner A., Morvillo N., (2002.): Randomly amplifiedpolymorphic andDNA (RAPD) analysis of the musk roses (*Rosa moschata*). Prac. Fla. State Hort. Soc., 115: 117-119.
11. García A.L., Franco J.A., Nuria N., Madrid V.R. (2006): Influence of amino acids in the hydroponic medium on the growth of tomato plants. Journal of Plant Nutrition 29: 2093-2104.
12. Gao X., Bjork L., Trajkovski V., Uggla M. (2000.): Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. J. Sci.Food Agric. 80:2021- 2027
13. Gautheret, R. J. (1934.): C R Ac Sc. 198, 2195-2196: Plant Propagation by Tissue Culture, ISBN: 0-9509325-0-7

14. George E.F., P.D. Sherrington. (1984.): Plant Propagation by Tissue Culture, Journal of Basic Microbiology, Volume 25, Issue 7, page 475.
15. Gheorghiţă G.0., Nicuţa D., Maftei D. E., Maftei I. D. (2012): Preliminary data of the in vitro culture response of Rosa canina L. species. Analele Ştiinţifice ale Universităţii 'Al I Cuza' din Iaşi. (Serie Nouă) Secţiunea II a. Genetică şi Biologie Moleculară 2012 Vol. 13 No. 2 pp. 67-73
16. Hessayon, David Gerald (2001.): Cvatući grmovi. Mozaik knjiga.
17. Jelaska S. (1994.): Kultura biljnih stanica i tkiva, Školska knjiga.
18. Kastori R. (2006): Fiziologija biljaka. Matica Srpska, Novi Sad.
19. Kaul V.K., Gujral R.K., Singh B., (1999.): Volatile constituents of the essential oil of flowers of Rosa brunonii Lindl. Flav. Fragr. J., 14: 9-11.
20. Leifert C., Waites W.M., Nicholas J.R.., (1989.): Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. Journal of Applied Bacteriology, Volume 67, Issue 4, pages 353-361. October 1989.
21. Leifert C., Waites W.M., Nicholas J.R., Keetley W.w. Julia (1990.): Yeast contaminants of micropropagated plant cultures. Journal of Applied Bacteriology, Volume 69, issue 4, pages 471-476, October 1990.
22. LevaA., RinaldiLaura M.R. (2012.): Recent advances in Plant *in vitro* Culture, ISBN 978-953-51-0787-3
23. Mahmood N., Piacente S., Pizza C., Burke A., Khan A.I., Hay A.J., (1996.):The anti-HIV activity and mechanisms of action of pure compounds isolated from Rosa damascena. Biochem. Biophys. Res. Comm.,229: 73-79.
24. Moallem S., Behbahani M., Mousavi E., i Karimi N. (2012.); Direct regeneration of Rosa canina trought tissue culture,Department of Horticulture, Branch Islamic Azad University, Karaj, Iran
25. Nobécourt, P. (1939.): C R Soc Biol. 130, 1270-1271.
26. Odutayao, O.I., Amusa, N.A., Okutade, O.O and Ogunsanwao Y.R.(2007.): Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria,Nigeria .
27. Paradiković Nada (2009.): Opće i specijalno povrćarstvo. Sveučilišni udžbenik. Tipo, Osijek.

28. Parađiković N.,Vinković T., Vinković Vrček I., Tkalec M., Lončarić Z., Milaković Z. (2011): Koncentracija Ca u plodu i listu paprike kao rezultat tretiranja biostimulatorima. Zbornik sažetaka 46. Hrvatskog i 6. Međunarodnog simpozija agronoma: 125-126.
29. Parađiković N., Vinković T., Vinković Vrček I., Tkalec M. (2013):Natural biostimulants reduce the incidence of BER in sweet yellow pepper plants (*Capsicum annuum* L.). Agricultural and food science. 22(2): 307-317.
30. Pati P.K., Rath S. P., Sharma M., Sood A., Ahuja P. S. (2005.): In vitro propagation of rose. Biotechnology advances, Elsevier, str. 163-176.
31. Pawłowska B. (2011.): The effect of BA and GA3 on the shoot multiplication of in vitro cultures of Polish wild roses. Folia Horticulturae. 23(2): 145-149.
32. Rout G.R., Debata B.K. (1989.): Micropropagation of propagation of *Rosa hybrida* cv Queen Elizabeth through *in vitro* culture of axillary buds.Orissa Journal of Horticulure, 16:19.
33. Salekjalali M., Jafari B. i Tarinejad A. (2011.): *In vitro*Multiplication of Rose (*Rosa hybrida* cv. Baccara), Iran, ISSN 1811-6769
34. Schmitz RY., Skoog F., Playtis AJ., Leonard NJ. (1972.): Cytokinins: synthesis and biological
activity of geometric and position isomers of zeatin. Plant Physiol., 50: 702-705.
35. Shirdel M., Motallebi-Azar A., Mahna N. (2012.): In vitro micropropagation of dog rose (Rosa canina L.). Acta Hort. (ISHS) 937:911-913
36. Skirvin R.M., Chu M.C., Young, H.J., (1990.): Rose. In:handbook of plant cell culture. Vol. 5. (Anmirato,P.V., Evans D.A., Sharp W.R. and Bajaja, Y.P.S.,Eds.). Mcgraw-Hill Publishing Inc., Newyork, USA,716.743.
37. Skoog F., Miller RA. (1957.): Chemical regulations of growth and organ formation in plant tissue culture in vitro. Sym. Soc. Exp. Biol., 11: 118- 131.
38. Šindrak Zoran (2013.): Divlje ruže; Važnost uporaba i uzgoj, Hrvatska Sveučilišna naklada, Zagreb.
39. Thi Lua H., Böhme M. (2001): Influence of humic acid on the growth of tomato in hydroponic systems. Acta Horticulturae (ISHS) 548: 451-458.

40. Tkalec M., Parađiković N, Zeljković S., Vinković T. (2012.): Učinkovitost biostimulatora na rast i razvoj divlje ruže, Book of abstract of 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture / Pospišil M. (ed). - Zagreb : Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 110-111 (ISBN: 9789537878009).
41. Torres KC (1989.): Tissueculture techniques for horticultural crops. New York ,London: Chapman and Hall.
42. Uggla M. i Martinsson M. (2005.): Cultivate the wild roses experiences from rose hip production in Sweden, ISHS
43. Vasil IK, Thorpe TA. (1998.): Plant cell and tissue culture. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ.
44. Vukadinović, V., Bertić, B. (1989.): Praktikum iz agrokemije i ishrane bilja. Skripta, Poljoprivredni fakultet, Osijek.
45. Vukadinović V., Lončarić Z. (1997.): Ishrana bilja, sveučilišni udžbenik, Poljoprivredni fakultet Osijek.
46. White P.R., (1963.): *The cultivation of Plant and Animal Cells*,2nd Ed., Ronald Press, New York.
47. Zeljković S., Parađiković N., Vinković T., Tkalec M., Maksimović I., Haramija J., (2013.):Nutrient status, growth and proline concentration of French marigold (*Tagetes patula* L.) as affected by biostimulant treatment. Journal of food agriculture & environment. 11(3/4): 2324-2327.

Internet stranice

1.Flora Croatica database: http://hirc.botanic.hr/fcd/

2.Gnojidba.info: http://www.gnojidba.info/

8. Sažetak

Istraživanje je provedeno u 2014. godini na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Pokus je postavljen u *in vitro* laboratorij u kontroliranim uvjetima. Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih koncentracija hormona u hranjivoj podlozi na rast i razvoj divlje ružeiutjecaj tretmana biostimulatorom na mineralni sastav nadzemne mase i korijena presadnica divlje ruže. Pokus se sastojao od dvadeset tikvica raspoređenih u četiri ponavljanja jedne varijante hranjive podloge (BI) i dvadeset tikvica druge varijante hranjive podloge (B). Prva varijanta hranjive podloga sadržavala je hormon BAP (6-benzil aminopurin) te hormon IBA (Indol-butilna kiselina), dok je druga varijanta podloge sadržavala samo hormon BAP. Tijekom istraživanja zabilježeni su broj izbojaka, masa i dužina korijena te masa i visina stabljike divlje ruže. Djelovanje biostimulatora pozitivno je utjecalo na povećanje sadržaja K i P u nadzemnom dijelu presadnica divlje ruže kao i na povećanje broja izbojaka i mase korijena, dok različite koncentracije hormona nisu imale značajni utjecaj na koncentraciju P, ali su pozitivno djelovale na koncentraciju Mg. Istraživanje ukazuje da primjena biostimulatora u proizvodnji presadnica divlje ruže poboljšava rast i razvoj korijena i nadzemnog dijela što je preduvjet brže adaptacije biljaka na stres uslijed presađivanja.

Ključne riječi:divlja ruža, mikropropagacija, biostimulator, hormoni.

9. Summary

The research was conducted in 2014 on the Faculty of Agriculture. Trials were conducted in vitro laboratory under controlled conditions. The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of hormones in growth media on the growth and development of wild roses and examine the impact of treatment biostimulant the mineral composition of plant mass and root seedlings of wild roses. The experiment consisted of twenty flasks in four repetitions of a single variety of culture medium (BI) and twenty flasks other variants of culture medium (B). The first variant of culture medium contained the hormones BAP (6-benzyl aminopurine) and hormone (indol-butyl acid), while the second variant of the substrate contained only hormone BAP. Investigated parameters were number of shoots, above-ground mass, root length and weight and plant height of the wild rose. Effect of bio-stimulant positively influenced the increase of K and P in the aerial part of seedlings of wild roses as well as the increase in the number of shoots and root mass, while different concentrations of the hormones had no significant effect on the concentration of P, but they had positive effects on the concentration of Mg. Research indicates that the application of bio-stimulant in the production of seedlings of wild rose improves the growth and development of roots and above-ground mass which is important for faster plant adaptation on stress during transplanting.

Key words: wild rose, micropropagation, bio-stimulator, hormones.

10. Popis slika

Slika 1: Kontaminacija hranjive podloge *Aspergillus sp.* izvor: http://aws.labome.com (str. 15).

Slika 2: Kontaminacija hranjive podloge *Fusarium* sp. (A), *Cladosporium* sp. (B), *Alternaria* sp. (C), *Rizopus* sp. (D) izvor: http://2.bp.blogspot.com, www.microscopy-uk.org, www.studyblue.com https://lh6.googleusercontent.com (str. 16).

Slika 3: Parni sterilizator-autoklav (A) i prikaz ostale laboratorijske opreme korištene pri pripremi eksplatanta- pincete, petrijeve zdelice,nož,plamenik (B) (foto: Tkalec, M.) (str. 18).

Slika 4: Eksplantanti divlje ruže presađeni na hranjivu podlogu (foto: Tkalec, M.) (str. 19).

Slika 5: Ožiljene biljke (foto: Tkalec, M.) (str. 20).

11. Popis tablica

Tablica 1. Koncentracija P (%) u nadzemnoj masi i korijenu presadnica divlje ruže pod utjecajem tretmana biostimulatorom te sastava hranjive podloge (str. 22).
Tablica 2. Sadržaj K (g kg^{-1}) u nadzemnom dijelu i korijenu presadnica divlje ruže pod utjecajem tretmana biostimulatorom te sastava hranjive podloge (str. 23).
Tablica 3. Sadržaj Ca (g kg^{-1}) u nadzemnom dijelu i korijenu presadnica divlje ruže pod utjecajem tretmana biostimulatorom te sastava hranjive podloge (str. 25).
Tablica 4. Sadržaj Mg (g kg^{-1}) u nadzemnom dijelu i korijenu presadnica divlje ruže pod utjecajem tretmana biostimulatorom te sastava hranjive podloge (str. 26.)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo smjer *Povrćarstvo i cvjećarstvo*

UDK:
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Poljoprivreda

MINERALNI SASTAV PRESADNICA DIVLJE RUŽE UZGOJENE *IN VITRO*

Matea Mazur

Sažetak: Istraživanje je provedeno u 2014. godini na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Pokus je postavljen u *in vitro* laboratorij u kontroliranim uvjetima. Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih koncentracija hormona u hranjivoj podlozi na rast i razvoj divlje ružeiutjecaj tretmana biostimulatorom na mineralni sastav nadzemne mase i korijena presadnica divlje ruže. Pokus se sastojao od dvadeset tikvica raspoređenih u četiri ponavljanja jedne varijante hranjive podloge (BI) i dvadeset tikvica druge varijante hranjive podloge (B). Prva varijanta hranjive podloga sadržavala je hormon BAP (6-benzil aminopurin) te hormon IBA (Indol-butilna kiselina), dok je druga varijanta podloge sadržavala samo hormon BAP. Tijekom istraživanja zabilježeni su broj izbojaka, masa i dužina korijena te masa i visina stabljike divlje ruže. Djelovanje biostimulatora pozitivno je utjecalo na povećanje sadržaja K i P u nadzemnom dijelu presadnica divlje ruže kao i na povećanje broja izbojaka i mase korijena, dok različite koncentracije hormona nisu imale značajni utjecaj na koncentraciju P, ali su pozitivno djelovale na koncentraciju Mg. Istraživanje ukazuje da primjena biostimulatora u proizvodnji presadnica divlje ruže poboljšava rast i razvoj korijena i nadzemnog dijela što je preduvjet brže adaptacije biljaka na stres uslijed presađivanja.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: Prof. dr. sc. Nada Parađiković, redovita profesorica

Broj stranica: 42
Broj grafikona i slika: 5
Broj tablica: 4
Broj literaturnih navoda: 49
Broj priloga: -
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: divlja ruža, mikropropagacija, biostimulator, hormoni

Datum obrane:
Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Jasenka Ćosić, predsjednik
2. Prof.dr.sc Nada Parađiković, mentor
3. Doc.dr.sc. Tomislav Vinković, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of Agriculture
University graduate study

UDK:
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Agriculture

MINERAL COMPOSITION OF WILD ROSE SEEDLINGS GROWN *IN VITRO*

Matea Mazur

Abstract: The research was conducted in 2014 on the Faculty of Agriculture. Trials were conducted in vitro laboratory under controlled conditions. The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of hormones in growth media on the growth and development of wild roses and examine the impact of treatment biostimulant on the mineral composition of plant mass and root seedlings of wild roses. The experiment consisted of twenty flasks in four repetitions of a single variety of culture medium (BI) and twenty flasks other variants of culture medium (B). The first variant of culture medium contained the hormones BAP (6-benzyl aminopurine) and hormone (indol-butyl acid), while the second variant of the substrate contained only hormone BAP.Investigated parameters were number of shoots, above-ground mass, root length and weight and plant height of the wild rose. Effect of bio-stimulant positively influenced the increase of K and P in the aerial part of seedlings of wild roses as well as the increase in the number of shoots and root mass, while different concentrations of the hormones had no significant effect on the concentration of P, but they had positive effects on the concentration of Mg. Research indicates that the application of bio-stimulant in the production of seedlings of wild rose improves the growth and development of roots and above-ground mass which is important for faster plant adaptation on stress during transplanting.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek
Mentor: DSc Nada Parađiković, full professor

Number of pages: 42
Number of figures: 5
Number of tables: 4
Number of references: 49
Number of appendices: -
Original in: Croatian

Key words: wild rose, micropropagation, biostimulant,hormones

Thesis defended on date:
Reviewers:

1. DSc Jasenka Ćosić, Full Professor, chair
2. DSc Nada Parađiković, Associate Professor, mentor
3. DSc Tomislav Vinković, Full Professor, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d.