# Utjecaj matatopolina na mikropropagaciju i zakorjenjivanje jabuke sorte Gala

**Petrović, Ana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:764841

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

*Repository / Repozitorij:*

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

# UTJECAJ METATOPOLINA NA MIKROPROPAGACIJU I ZAKORJENJIVANJE JABUKE SORTE GALA

DIPLOMSKI RAD

Ana Petrović

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Biljne znanosti

# UTJECAJ METATOPOLINA NA MIKROPROPAGACIJU I ZAKORJENJIVANJE JABUKE SORTE GALA

DIPLOMSKI RAD

Ana Petrović

Mentor:

doc. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

# IZJAVA STUDENTA
## O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ana Petrović**, JMBAG 0178099073, rođena 29.01.1995. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**UTJECAJ METATOPOLINA NA MIKROPROPAGACIJU I ZAKORJENJIVANJE JABUKE SORTE GALA**

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*

# IZVJEŠĆE

## O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Ane Petrović**, JMBAG 0178099073, naslova

**UTJECAJ METATOPOLINA NA MIKROPROPAGACIJU I ZAKORJENJIVANJE JABUKE SORTE GALA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana_____ .

Povjerenstvo: potpisi:

- doc.dr.sc. Anita Bošnjak Mihovilović mentor_____
- prof.dr.sc. Snježana Kereša član _____
- izv.prof.dr.sc. Tatjana Prebeg član _____

# Zahvala

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr. sc. Aniti Bošnjak Mihovilović na uloženom trudu, na vođenju kroz ovaj diplomski rad koji bi bilo nemoguće napisati bez danih savjeta, na beskrajnoj strpljivosti, razumijevanju i vremenu koje uložila u realizaciju ovog rada. Od srca veliko hvala.*

*Posebno se želim zahvaliti prof. dr. sc. Tatjani Prebeg na pomoći oko realizacije ovog istraživanja, na otvorenim vratima za sve upite te vremenu i radu koji je uložila.*

*Želim se zahvaliti svim svojim kolegama i prijateljima na fakultetu koji su bili uvijek tu za savjete, za druženje, kao velika pomoć i potpora kroz cijelo vrijeme studiranja. Time je svatko od njih dio ovog mog uspjeha.*

*Također zahvaljujem svim prijateljima koji su bili uz mene u dobrim i lošim događajima, koji su sa mnom proživjeli i rasli svaki dan studiranja i života. Hvala na svakom savjetu, svakom razumijevanju, svakom slušanju i potpori.*

*Na kraju želim zahvaliti svojoj obitelji, posebno mami, tati i sestri koji su bili uz mene na svaki način koji je moguće zamisliti, pružali mi beskonačnu potporu, ljubav i imali nebrojeno puno sekunda strpljenja. Hvala na svakom osmjehu, poticaju, ohrabrenju i savjetu. Sve što sam u životu postigla, zbog njih je i zato im hvala.*

# SADRŽAJ

1.UVOD ..... 8
2. PREGLED LITERATURE ..... 10
2.1 MALUS DOMESTICA ..... 10
2.1.1. MALUS DOMESTICA ‚*GALA'* ..... 10
2. 2. PODRIJETLO, AGROEKOLOŠKI UVJETI I UZGOJ ..... 11
2.3. KEMIJSKI SASTAV PLODA I NUTRITIVNA VRIJEDNOST ..... 12
2.4. RAZMNOŽAVANJE JABUKE ..... 14
2.4.1. GENERATIVNO RAZMNOŽAVANJE JABUKE ..... 14
2.4.2. VEGETATIVNO RAZMNOŽAVANJE JABUKE ..... 14
2.5 MIKROPROPAGACIJA JABUKE ..... 15
2.5.1. PREDNOSTI I NEDOSTACI MIKROPROPAGIRANJA ..... 16
2.5.2. MEDIJI ZA MIKROPROPAGACIJU JABUKE ..... 17
2.5.3. CITOKININI U PODLOGAMA ZA MIKROPROPAGACIJU JABUKE ..... 18
2.6. FOTOSINTEZA ..... 19
2.6.1. KLOROPLASTI ..... 21
2.6.2 KAROTENOIDI ..... 22
2.6.3. PUČI ..... 22
3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA ..... 24
3.1. BILJNI MATERIJAL ..... 24
3.2. TRETMAN CITOKININIMA ..... 24
3.3. ZAKORJENJIVANJE IZDANAKA ..... 24
3.4. UVJETI U KOMORI RASTA ..... 25
3.5. ANALIZA GLAVNIH SASTAVNICA LISTA MIKROPROPAGIRANIH IZDANAKA ..... 25
3.6. MJERENJE KONCENTRACIJE KLOROFILA I KAROTENOIDA ..... 25
3.7. BROJ PUČI PO JEDINICI LISNE POVRŠINE ..... 26
3.8 PLAN POKUSA I ANALIZA PODATAKA ..... 26
4. REZULTATI I RASPRAVA ..... 27
4.1.REZULTATI ANALIZE DULJINE MIKROPROPAGIRANIH IZDANAKA I STOPE MULTIPLIKACIJE ..... 27
4.2. REZULTATI MJERENJA KONCENTRACIJE FOTOSINTETSKIH PIGMENATA ..... 28
4.3 REZULTATI ANALIZE GLAVNIH MORFOMETRIJSKIH PARAMETARA LISTA ..... 29
4.4 BROJ PUČI PO JEDINICI LISNE POVRŠINE ..... 30

4.5 USPJEŠNOST ZAKORJENJIVANJA ..... 33
5. ZAKLJUČAK ..... 35
6. LITERATURA ..... 36
7. ŽIVOTOPIS ..... 39

# Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ane Petrović**, naslova

**UTJECAJ METATOPOLINA NA MIKROPROPAGACIJU I ZAKORJENJIVANJE JABUKE SORTE GALA**

Zbog nuspojava benzilaminopurina (BAP-a) kao što su nekroza vrha izdanka, inhibicija zakorjenjivanja te teškoće pri aklimatizaciji u literaturi se kao alternativa BAP-u navodi hidroksilirani analog BAP-a – metaTopolin (mT). Kroz ovaj rad istraživao se utjecaj metaTopolina i BAP-a na mikropropagaciju jabuke sorte Gala pri čemu se procjenjivala duljina i razvijenost izdanaka te količina klorofila; duljina, širina i površina lista te broj puči po površini lista. Izdanci su zakorjenjeni na MS mediju s dodatkom 2 mg/l IAA i procijenjena je uspješnost zakorjenjivanja s obzirom na prethodni medij (prethodno korišten citokinin). Izdanci razvijeni na podlozi sa citokininom mT imali su veću lisnu površinu, duljinu i širinu listova. Sadržaj klorofila u listu i broj puči po površini lista se nisu statistički razlikovali za biljke sa oba tretmana dok je zakorjenjivanje bilo uspješnije kod biljaka sa tretmana BAP-om.

Ključne riječi: jabuka, mikropropagacija, citokinin, metaTopolin, BAP, zakorjenjivanje

# SUMMARY

Of the master's thesis – student **Ana Petrović,** entitled

**EFFECT OF METATOPOLIN ON MICROPROPAGATION AND ROOTING APPLE TYPE GALA**

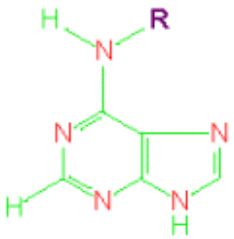
Due to the side effects of benzylaminopurine (BAP), such as shoot top necrosis, inhibition of rooting, and difficulty in acclimatization, a hydroxylated analogue of BAP - metaTopolin (mT) has been cited as an alternative to BAP. Through this work, the influence of metaTopolin and BAP on micropropagation of Gala apples was investigated, estimating the length and development of shoots and the amount of chlorophyll; the length, width and area of the leaf and stomatal density. The shoots were rooted on MS medium supplemented with 2 mg / l IAA and the rooting performance was evaluated with respect to the previous medium (cytokinin previously used). The shoots developed on cytokinin mT substrate had larger leaf area, leaf length and width. Chlorophyll content in the leaf and stomatal density were not statistically different for plants with both treatments, whereas rooting was more successful with plants with BAP treatment.

**Keywords:** apple, micropropagation, cytokinin, metaTopolin, BAP, rooting

# 1.UVOD

Citokinini ( *grč. kretati se*) su biljni hormoni rasta koji se najčešće koriste zajedno sa auksinima, imaju ulogu u fiziološkim procesima biljke i samom razvoju biljke. Najvažniji su hormoni za stimuliranje diobe stanica, a najveće koncentracije citokinina nalazimo u tkivima koja intenzivno rastu kao što su vegetativni vrhovi biljaka, embriji i plodovi. Poznate su i neke vrste bakterija koje stvaraju i izlučuju citokinine ili djeluju na biljke tako da biljne stanice povećaju proizvodnju citokinina. Uz kontrolu diobe stanica imaju i velik utjecaj na odgađanje starenja tkiva, prijenosu hranjivih tvari, sazrijevanje kloroplasta te veliku ulogu u kontroli apikalne dominacije. Vrlo važno svojstvo citokinina je i stvaranje kalusa pri ozljedama biljnog tkiva te zatvaranje „rana“ i samim time sprječavanje infekcija i bolesti.

Danas, svi poznati prirodni citokinini  po kemijskom sastavu su $N^6$-supstituirani derivati adenina a na 6 C atomu adenina imaju vezan pobočni lanac od 5 C atoma (Slika 1.1.). Uz prirodne citokinine postoje i sintetizirani koji imaju citokininsku aktivnost i gotovo svi $N^6$-supstituirani su derivati adenina. Benzil – adenin (BA) je primjer sintetskog citokinina koji u svom pobočnom lancu ima prstenastu strukturu. Još nije potpuno razjašnjeno zbog čega su sintetski citokinini aktivni, međutim pretpostavlja se da potiču biosintezu prirodnih citokinina, dok su neki od sintetskih istog djelovanja kao i prirodni , neki čak i jačeg djelovanja. Već spomenuti benzil- adenin je u nekim biotestovima pokazao veću aktivnost od najjačeg prirodnog citokinina zeatina (Pevalek-Kozlina, B., 2003).




Slika 1.1. struktura citokinina

(Izvor: http://www.znanje.org/i/i25/05iv02/05iv0211fll/index4.htm)

Jedan od najkorištenijih citokinina je 6-benzilamino purin (BAP) koji ima sva svojstva citokinina, a u proizvodnji se koristi od klijanja do žetve ili berbe. Često korišteni BAP opće je prihvaćen zbog velike bioaktivnosti i niske cijene međutim u nedavnim istraživanjima je dokazano da je BAP povezan sa inhibicijom rasta korijena i heterogenosti izdanka ( Werbrouck i sur. 1995). Takva pojava pokušala se objasniti sa akumulacijom neaktivnih citokinina 9 glikozida ili povećanom sintezom etilena. Daljnjim istraživanjem došlo se do teze da BAP može inhibirati rast korijena nekim drugim još neistraženim mehanizmom u kojem posrednik nije etilen (Auer, 1996). Istraživanja su također dokazala da BAP neovisno o produkciji etilena smanjuje mitotičku aktivnost proksimalnog meristema korijena dok povećanom aktivacijom proizvodnje etilena smanjuje elongaciju stanica, a time i rast korijena (Podlešáková i sur. 2012.).

Meta-topolin (mT) je aromatski citokinin izoliran iz lišća topole po čemu je i dobio ime. Metabolizam mT ne razlikuje se mnogo od metabolizma ostalih citokinina, jedina značajnija razlika od BAP-a je to što nije zabilježena inhibicija rasta korijena kao što je kod BAP-a u većim količinama ( Werbrouck, 2010). Najveća razlika mT-a od BAP-a jest u kemijskoj strukturi jer je mT hidroksilirani derivat BAP-a koji se deaktivira glukozilacijom bočnog lanca te služi kao skladišni oblik citokinina koji se može postupno hidrolizirati te time otpuštati aktivnu supstancu i produžiti vrijeme učinka citokinina (Prerostova i sur. 2018.). Danas se u komercijalne svrhe već mikropropagira na hranjivim podlogama s dodatkom mT, najčešće za banane, jabuke, jagode, ukrasne ruže te krumpir (Plíhal i sur. 2013.).

- **CILJ RADA**

Zbog navedenih razlika između BAP-a i mT-a cilj ovog istraživačkog rada bio je istražiti utjecaj mT na mikropropagaciju jabuke sorte Gala pri čemu je tretman jednake koncentracije BAP-a služio kao kontrola. Izdanci razvijeni na ovim tretmanima su zakorjenjeni u *in vitro* uvjetima pri čemu je praćen utjecaj citokinina korištenog u fazi multiplikacije.

Hipoteze koje su postavljene prije istraživanja su da će se izdanci hranidbenom mediju s dodatkom mT bolje razvijati, imati veću vegetativnu masu te veću stopu multiplikacije te će uspješnije zakorijenjivati.

# 2. PREGLED LITERATURE

## 2.1 MALUS DOMESTICA

Jabuka ( *Malus domestica Borkh.*) pripada porodici ruža i listopadno je drvo koje najčešće naraste od 1,8 metara do 4,6 metara, a zabilježeni su primjerci do čak 12 metara. Krošnja je razgranata, gusta i široka, a deblo može biti različitog promjera međutim zabilježeno je i do jedan metar u promjeru. Kora ovisno o sorti i klimatu u kojem se uzgaja varira i može biti od svjetlo sive boje do tamno smeđe pri čemu je često ispucana te se ljušti u tanjim ili debljim ljuskama (Godet, 2000.).

Vršni pupovi su veći i jajoliki dok su postrani pupovi manji polegnuti uz granu. Listovi su ovalnog oblika, naizmjenični i jednostavni sitnonazubljenog ruba postavljeni na peteljkama. Dugi su 4 – 13 cm, a široki 3 – 7 cm, zelenog sjajnog i slabo dlakavog lica te sivo zelenog dlakavog naličja.

Cvjetovi su dvospolni, pravilni, promjera 3 – 4 cm, bijelih latica koje se nalaze iznad kratkih lapova. Stapke cvjetova su dlakave i duge do 3 cm, a cvjetovi mogu rasti pojedinačno ili kao štitasti cvatovi sa 4 – 5 cvijeta. Ocvijeće je dvostruko, sastoji se od čaške i vjenčića pri čemu se čaška sastoji od 5 zelenih lapova, a vjenčić od 5 bijelih latica koje mogu biti roze boje prema krajevima. Cvatnja traje do 20 dana a ovisno o uvjetima u tekućoj godini proteže se od početka travnja do kraja travnja i početka svibnja. Plodnica je jedna te je podrasla sa 4 – 5 sraslih plodnih listova dok prašnika ima mnogo te na vrhu imaju žute prašnice (Godet, 2000.).

### 2.1.1. MALUS DOMESTICA ,*GALA'*

Jabuka sorte Gala je jedna od mnogobrojnih sorata koje se proizvode u komercijalne svrhe te je jedna od najčešće uzgajanih sorata svijeta. Podrijetlom je s Novog Zelanda međutim prilagođena je i drugim klimatskim uvjetima te se u svijetu koristi za uzgoj ploda ili oprašivanje. Plodovi su zreli u kasno ljeto ili jesen stoga spada u srednje rane ili jesenske sorte, a ističu se izrazito slatkim okusom, mekom kožicom koja lagano puca, sočnih i hrskavim mesom ploda, te svjetlijom korom koja varira od žute do narančaste boje sa crvenim prugama (Slika 2.1.). Uz to što se vrlo često koristi

u kulinarstvu kao desertno slatko voće, jabuka sorte Gala je često korištena u biotehnološkim istraživanjima.



Slika 2.1. jabuka sorte Gala

(izvor: https://www.agroklub.com/vocarstvo/zapocela-berba-gale-atraktivne-ljetne-sorte-jabuka/7448/)

## 2. 2. PODRIJETLO, AGROEKOLOŠKI UVJETI I UZGOJ

Domaća jabuka je podrijetlom iz južnog Sibira i Azije, a već su stari Rimljani i Grci poznavali različite sorte te križali kultivare. Genski centar koji je najvažniji za sorte koje su i danas u upotrebi je istočna Turska i Kavkaz, a za veliku raznolikost i rasprostranjenost po Europi u velikoj mjeri zaslužan je Aleksandar Veliki koji je oko 300 godina prije Krista u Europu donio sortu iz Male Azije u Grčku. Za svoje vladavine Karlo Veliki naredio je sadnju jabuka na području cijele današnje Njemačke, a za vrijeme kolonizacije Velike Britanije, jabuka je prenesena u Sjevernu i Južnu Ameriku.

U vegetaciji jabuka najbolje uspijeva pri temperaturi 14 – 19 °C iako može bez većih posljedica izdržati i zimske temperature od -25 do -28 °C, a ljeti temperature do 35 °C. Najveći problem predstavlja vjetar na koje su neke sorte jabuka pri oplodnji jako osjetljive te tuča koja stvara velike ekonomske gubitke u bilo kojem razvoju vegetacije (https://www.savjetodavna.hr/). Kritično razdoblje za vodu je u vremenu cvatnje dok je tlo pogodno za uzgoj jabuke pjeskovito-ilovastog sastava sa blago kiselom reakcijom, barem 3 % humusa i dobrim poljskim vodnim kapacitetom (Krpina i sur. 2004.).

U uzgoju jabuka najčešći uzgojni oblik je vitki vretenasti grm ili kombinacija vretenastog grma i vitkog vretenastog grma. Sadnja presadnica može se obavljati u jesen ili proljeće, a rezidba se uglavnom u intenzivnom uzgoju obavlja u rano ljeto zbog osvjetljenja unutrašnjeg dijela krošnje i smanjenog prskanja, pri čemu se treba obratiti pozornost na rodne grane. U prvim godinama nakon sadnje treba se obratiti veliku pažnju prihrani biljaka KAN-om (Hass, 2008).

## 2.3. KEMIJSKI SASTAV PLODA I NUTRITIVNA VRIJEDNOST

Kemijski sastav pa tako i nutritivna vrijednost ploda jabuke varira od sorte do sorte iako je u grubo kemijski sastav među kultivarima sličan. Najviše se u plodu nalazi vode kao i u svakom svježem voću i povrću te se vrijednost kreće oko 85% (Tablica 2.1.). Nakon vode kemijski najzastupljeniji su ugljikohidrati sa 10 – 15 % ovisno o sorti, dok su masti i proteini prisutni u vrlo malim količinama (također oviseći o sorti) i zajedno čine manje od 0.5 % ukupne mase ploda. Sa oko 3% u plodu su zastupljena vlakna i to topljiva u vodi odnosno u najvećoj mjeri je to pektin koji se nalazi u kori ploda (Bašić, 2017).

Plod jabuke nema veliku kalorijsku vrijednost ali se odlikuje velikom količinom vitamina kao što su vitamin A, vitamin $B_6$, vitamin C, te mineralom kalijem (Tablica 2.2.). Uz navedeno, vrlo veliki značaj za kemijski sastav jabuke imaju flavonoidi, karotenoidi, izoflavonoidi i fenoli koji u organizmu djeluju kao antioksidansi (Bašić, 2017) .

Ugljikohidrati koji se nalaze u jabuci su jednostavni šećeri odnosno monosaharidi i disaharidi. Kod jabuka, fruktoza je u plodu u svim sortama zastupljena gotovo u jednakoj mjeri kao i saharoza i glukoza što jabuku svrstava među namirnice niskog glikemijskog indeksa te ju time čini pogodnom za prehranu osoba koje pate od bolesti gušterače i problema s regulacijom šećera u krvi.

Tablica 2.1. općeniti sastav ploda jabuke sorte Gala na 100 grama uzorka ( USDA, 2018.)

| Sastav jabuke sorte Gala | jedinica | Vrijednost u 100 grama uzorka |
|---|---|---|
| **energija** | kcal | 57 |
| **voda** | g | 85,76 |
| **proteini** | g | 0,25 |
| **masti** | g | 0,12 |
| **vlakna** | g | 2,3 |
| **šećeri** | g | 10,37 |

Tablica 2.2. vitaminsko-mineralni sastav ploda jabuke sorte Gala na 100 grama uzorka ( USDA, 2018.)

| Vitaminsko-mineralni sastav jabuke sorte Gala | jedinica | Vrijednost u 100 grama uzorka |
|---|---|---|
| **Kalcij, Ca** | mg | 7 |
| **Željezo, Fe** | mg | 0,12 |
| **Magnezij, Mg** | mg | 5 |
| **Fosfor, P** | mg | 11 |
| **Kalij, K** | mg | 108 |
| **Natrij, Na** | mg | 1 |
| **Cink, Zn** | mg | 0,05 |
| **Niacin** | mg | 0,075 |
| **Vitamin $B_6$** | mg | 0,049 |
| **Vitamin E** | mg | 0,18 |
| **Vitamin A** | IU[1] | 28 |
| **tiamin** | mg | 0,017 |
| **riboflavin** | mg | 0,029 |

[1] Mjerna jedinica za količinu tvari utemeljena na izmjerenoj biološkoj aktivnosti

## 2.4. RAZMNOŽAVANJE JABUKE

Jabuka se može razmnožavati vegetativno i generativno, a ovisno o načinu razmnožavanja odlučuje se o tehnologiji uzgoja biljaka. Generativnim razmnožavanjem smatra se razvoj biljaka iz sjemena dok je vegetativno razmnožavanje, razmnožavanje reznicama i mikropropagacijom u *in vitro* uvjetima. ( Krpina i sur. 2004.)

### 2.4.1. GENERATIVNO RAZMNOŽAVANJE JABUKE

Generativnim razmnožavanjem događa se rekombinacija gena zbog čega se ne može znati hoće li se poželjne osobine matične biljke zadržati. Zbog navedenog razloga razmnožavanje za intenzivni uzgoj najčešće je vegetativno dok je generativno razmnožavanje bitno za otkrivanje novih poželjnih gena i svojstva sorata.

### 2.4.2. VEGETATIVNO RAZMNOŽAVANJE JABUKE

Ovaj način razmnožavanja od posebne je važnosti za one kultivirane vrste koje u određenim uvjetima uzgoja ne stvaraju sjeme ili je sjeme loše kvalitete (Dubravec, 1996). Vegetativnim razmnožavanjem smatramo zakorjenjivanje ili cijepljenje odnosno kalemljenje biljaka. Važnost sorte je očuvanje svojstva te biljke koji su za nju karakteristična, a vegetativnim se razmnožavanjem svojstva očuvaju te se na taj način vrlo lako razmnožavaju biljke za uzgoj. Neke se biljke lakše razmnožavaju zakorjenjivanjem te se na taj način proizvode podloge za cijepljenje biljaka. Prema tome postoje generativne podloge dobivene direktno iz sjemena i vegetativne podloge dobivene zakorjenjivanjem. Biljke koje se lako vegetativno razmnožavaju zakorjenjivanjem su: smokva, ljeska, malina, ribiz, nar, dunja, šljiva i neke sorte jabuka (Kantoci, 2006).

Cijepljenje ili kalemljenje je oblik vegetativnog razmnožavanja, odnosno operacija kojom se dio biljke zvan plemka prenosi na dio biljke zvan podloga s namjerom da međusobno srastu u nov organizam (Kantoci, 2006). Postoji mnogo

različitih načina cijepljenja plemke na podlogu kao što su : okuliranje, cijepljenje pod koru, cijepljenje u raskol, cijepljenje na isječak i mnogi drugi, a svima je u cilju stvaranje podudarnog spoja u svrhu boljeg roda plemke.

## 2.5 MIKROPROPAGACIJA JABUKE

Već poznate metode vegetativnog razmnožavanja nisu pogodne za stvaranje biljnog materijala bez bolesti te uvelike ovise o sezoni. Mikropropagacijom je riješen problem biljnih bolesti te se biljke mogu puno brže i efikasnije razmnožiti, a cijena proizvodnje se time može smanjiti zbog uštede sredstva koje se troše na grijanje staklenika, uštede vremena proizvodnje i smanjenja proizvodne površine (Dobránszki i sur. 2014).

Glavna prednost mikropropagacije jabuke je to što jabuka ima jako velik kapacitet za umnažanje ciljanog biljnog materijala u usporedbi sa konvencionalnim načinima vegetativnog razmnožavanja. Uz to prednost je sposobnost proizvodnje potomstva tijekom cijele godine, proizvodnja biljnog materijala bez bolesti te mogućnost umnažanja genotipova koji su sterilni ( Dobránszki i sur. 2014).

Glavne faze mikropropagacije su slijedeće:

1.) uspostavljanje kulture *in vitro* pri čemu se provodi sterilizacija biljnog materijala

2.) umnožavanje/multiplikacija izdanaka

3.) zakorjenjivanje

4.) aklimatizacija zbog prilagođavanja biljaka na jači intenzitet fotosinteze i proizvodnje fotosintetskih produkata te na smanjenu vlagu.

Izbor biljnog materijala kojim se započinje mikropropagacija je bitan jer o zdravim i reprezentativnim izbojcima ovisi cijeli proces. Uspjeh mikropropagacije ovisi o sorti i tipu eksplatanta. Određene sorte pokazuju veći potencijal umnažanja u mikropropagaciji te su pogodnije za takvu vrstu vegetativnog razmnožavanja. Primijećene su značajne razlike u kontaminaciji biljnog tkiva ovisno o dobu uvođenja u

kulturu *in vitro*. Svaki uzorak koji se uvodi u kulturu potrebno je sterilizirati zbog uspjeha mikropropagacije. Dobránszki i sur. (2014.) primjetili su da biljna tkiva koja se uvode u kulturu u proljetnim i ljetnim mjesecima imaju veći stupanj kontaminacije prije steriliziranja od biljaka koje se u kulturu uvode u zimskim i jesenskim mjesecima.

### 2.5.1. PREDNOSTI I NEDOSTACI MIKROPROPAGIRANJA

Mikropropagacija je sve češći način vegetativnog razmnožavanja zbog brojnih prednosti kao što su:

- razmnožavanje *in vitro* je puno brže od razmnožavanja *in vivo*
- biljke razmnožene *in vitro* često se puno brže i bolje razviju od biljaka razmnoženih *in vivo*
- U kulturu se uzimaju zdrave biljke bez patogena stoga nema prijenosa virusnih bolesti i uzgojeni materijal je reprezentativan i zdrav
- Potrebe za prostorom koji se koristi se smanjuju te se time smanjuje i novčano ulaganje
- Zbog stvaranja presadnica u kontoliranim uvjetima moguća je proizvodnja kroz cijelu godinu
- Uzgojene biljke se mogu zakorjeniti pa nije potrebno cijepljenje, međutim kod jabuka se i dalje prakticira cijepljenje zbog veće rodnosti, otpornosti na patogene i bujnosti same biljke
- *In vitro* kulture pogodne su za stvaranje banke gena (Jelaska, 1994).

Uz navedene prednosti postoje i mane mikropropagacije, međutim ako ih usporedimo sa prednostima, one ne umanjuju važnost mikropropagacije u proizvodnji biljaka. Neki od nedostataka su:

- Nakon prijenosa biljaka iz *in vitro* u *in vivo* uvjete biljke mogu pokazivati negativne posljedice te je potrebno neko vrijeme aklimatizacije
- Sukladno prethodnoj točki neke vrste biljaka vrlo se teško aklimatiziraju u uvjetima *in vivo*

- Mikropropagirana biljka može biti osjetljivija na patogene za vrijeme aklimatizacije zbog razvoja u *in vitro* sterilnim uvjetima
- Određeni kalus ili supkultura stanica nakon određenog broja razmnožavanja može izgubiti regenerativnu sposobnost
- Kod nekih biljnih vrsta ili njihovih genotipova vrlo je teško uspostaviti genetičku stabilnost ili sterilnu izolaciju eksplantata. (Jelaska, 1994).

### 2.5.2. MEDIJI ZA MIKROPROPAGACIJU JABUKE

U literaturi se često spominje MS podloga koja je korištena za mikropropagaciju mnogih kultura.Kada se u literaturi spominje MS podloga podrazumijeva se sastav mineralnih soli koji je konstantan dok se količina ostalih dodataka može mijenjati ovisno o potrebama određene biljke ili provođenju istraživanja (Jelaska, 1994).

Tablica 2.3. kemijski sastav Murashige-Skoog podloge ( Murashige i Skoog, 1962).

| Sol | Količina ( mg/l) |
|---|---|
| **$NH_4NO_3$** | 1650 |
| **$H_3BO_3$** | 6,2 |
| **$CaCl_2$ x $2H_2O$** | 440 |
| **CoCl x $6H_2O$** | 0,025 |
| **$CuSO_4$ x $5H_2O$** | 0,025 |
| **$FeSO_4$ x $7H_2O$** | 27,8 |
| **$MgSO_4$ x $7H_2O$** | 370 |
| **$MnSO_4$ x $7H_2O$** | 22,3 |
| **KI** | 0,83 |
| **$KNO_3$** | 1900 |
| **$KH_2PO_4$** | 170 |
| **$Na_2$ x EDTA** | 37,3 |
| **$Na_2MoO_4$ x $2H_2O$** | 0,25 |
| **$ZnSO_4$ x $7H_2O$** | 8,6 |

Najčešći hranidbeni medij/podloga za mikropropagaciju jabuke je MS medij odnosno Murashige i Skoog ( Tablica 2.3). Provedena su istraživanja u kojima su korištene druge hranidbene podloge kao što su Lepoivre (Quoirin i sur., 1977.) i C (Cheng, 1978), međutim najboljim se pokazao MS medij u formiranju izdanaka te je imao najučinkovitiju proizvodnju izdanaka (Dobránszki i sur. 2014). Također, praćena su svojstva duljine izdanka, lisne površine izdanaka te sadržaj klorofila i promjena tih svojstva s obzirom na medij na kojem su izdanci mikropropagirani. U istraživanju proučavao se efekt bora u koncentracijama od 0,1 do 6,0 mM te utjecaj na količinu svježe mase i koncentraciju klorofila. Utvrđeno je da je povećana koncentracija bora u podlozi značajno smanjila ukupnu svježu masu, duljinu izdanaka te sadržaj klorofila u biljkama. U biljkama se količina bora, fosfora, kalcija i magnezija povećala, a kalija, željeza, mangana i cinka smanjila što je povezano sa većom koncentracijom bora u mediju i njegovim negativnim utjecajem na transport i usvajanje navedenih minerala u biljkama (Dobránszki i sur. 2014).

### 2.5.3. CITOKININI U PODLOGAMA ZA MIKROPROPAGACIJU JABUKE

Multiplikacija izdanka ovisi o aktivnosti aksilarnih meristema koje hormonski kontroliraju uglavnom citokinini; međutim, djeluju u interakciji s auksinima iako je efekt auksina neizravan (Ward i Leyser, 2004). Multiplikacija izdanaka jabuke temelji se na hranidbenom mediju uz dodatak citokinina kao glavnih regulatora rasta. Auksini se dodaju u nižoj koncentraciji. Pregled literature o učinku različitih regulatora rasta na mikropropagaciju jabuke opisan je u radu Dobránszki i sur. 2014. U većini navedenih istraživanja kao izvor citokinina se koristi BAP, u rasponu koncentracija između 0,5 i 2 mg / l.

Prema Bairu i sur. (2007.) pri većim koncentracijama kemijski stabilan BAP počinje imati inhibitorno djelovanje na rast izdanaka i zakorjenjivanje te stvara heterogenost u rastu čime se gubi svrha mikropropagacije. Kao najčešći citokinini koji su korišteni u podlogama za mikropropagaciju jabuke u tom istraživanju, korišteni su

sintetski BAP te prirodni zeatin. Smatra se da se povećanom koncentracijom sintetskih citokinina, posebice BAP-a, događa rapidna degradacija biljnog tkiva zbog deaktivacije enzima citokinin oksidaze/dehidrogenaze, također, inhibitorne tvari se akumuliraju u biljnom tkivu i na taj način potiču još veću i dugotrajniju inhibiciju rasta i razvoja izdanaka(Adeyemi i sur. 2012).

Zbog neželjenih posljedica sintetskih citokinina sve se više istraživanja počinje raditi sa citokininom metaTopolin koji je hidrolizirani oblik BAP-a. Prema istraživanjima mT kao prirodni citokinin nema neželjene posljedice kao sintetski citokinini, a zbog svoje kemijske strukture ne akumulira se u biljnom tkivu već ima produljeno djelovanje što smanjuje mogućnost inhibicije rasta u mikropropagaciji (Prerostova i sur., 2018).

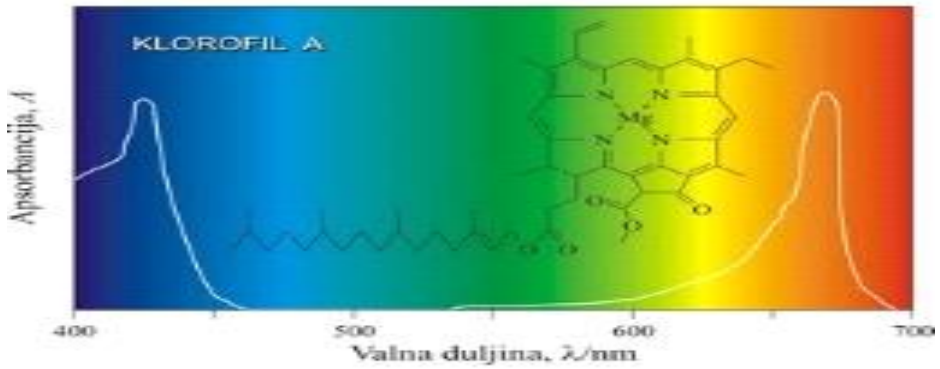
## 2.6. FOTOSINTEZA

Biljke kao autotrofni organizmi provode fotosintezu, a uz biljke provode ju i neke bakterije te alge. Fotosinteza je fiziološki proces u kojem se uz sunčevu energiju iz anorganskih spojeva $CO_2$ i vode u biljci stvara energija u obliku šećera te kisik koji se otpušta u atmosferu. Energija koja se stvara fotosintezom potrebna je biljci za sve procese koji se provode u biljci, a kroz hranidbeni lanac koristi i drugim organizmima.

Biljke posjeduju biljna bojila – pigmente, koji apsorbiraju svjetlosnu energiju i pretvaraju je u kemijsku energiju. Kloroplasti se mogu orijentirati kako bi se postavile u povoljan položaj u odnosu na svjetlost (Pevalek-Kozlina, 2003).

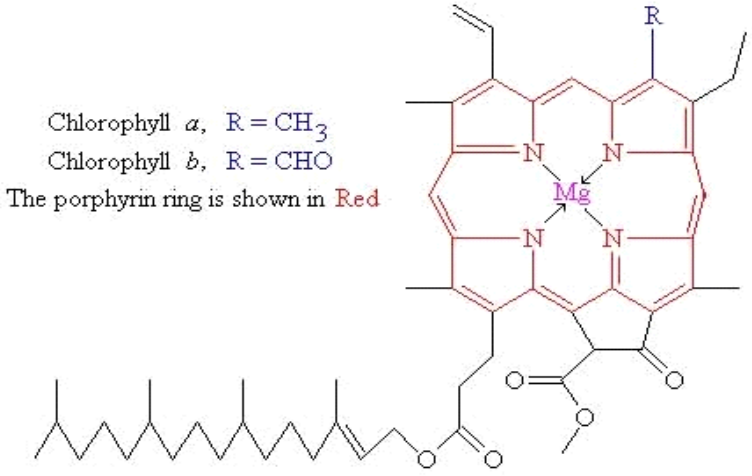
Fotosinteza se odvija u spektru vidljive svjetlosti te je najintenzivnija u području crvene i ljubičasto-plave svjetlosti odnosno na valnoj duljini 400 – 450 nm i valnoj duljini 650 – 700 nm ( Slika 2.2.). U kloroplastima lista, organelima biljaka, nalazi se klorofil pigment koji daje zelenu boju lišću i koji je odgovoran za proces fotosinteze. Klorofil ( Slika 2.3.) je molekula slična hemoglobinu u krvi te je građen od četiri pirolna prstena a u središtu je molekula magnezija (Pevalek-Kozlina, 2003).

Proizvedeni kisik u reakciji fotosinteze izlazi iz biljke u atmosferu i izlučuje se kroz puči koje su najgušće raspoređene na listovima biljaka. Broj puči se može razlikovati s obzirom na intenzitet svjetlosti na kojem se list razvijao, a ovisno o dobu dana i okolišnim uvjetima otvaraju se i zatvaraju.




Slika 2.2. apsorpcijski spektar klorofila a

( izvor: https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=klorofil )

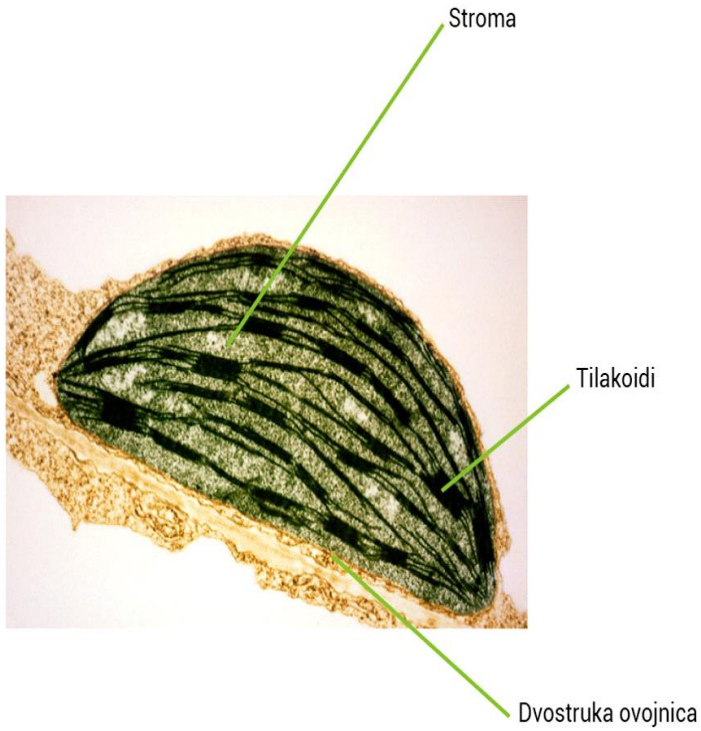



Slika 2.3. molekula klorofila

( izvor: https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/biljni-pigmenti )

## 2.6.1. KLOROPLASTI

Organeli u kojima se cijeli proces fotosinteze obavlja su kloroplasti. Kloroplast je vrsta plastida koji se nalazi u citosolu stanice te su od svih vrsta plastida najvažniji i najbrojniji u fotosintetski aktivnim dijelovima biljke. Kloroplasti ( Slika 2.4.) su organeli obavijeni sa dvije membrane koje su po endosimbiotskoj teoriji nastale simbiozom cijanobakterije sa prokariotskom stanicom te unutrašnja membrana tvori tilakoide na kojima se odvija proces fotosinteze. Unutrašnji prostor u kloroplastu naziva se stroma ( Dubravec, 1996.).




Slika 2.4.. kloroplast

(izvor: https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/8ec53af1-0bc2-443e-b783-c5a04e14f4cf/biologija-1/m03/j06/index.html )

### 2.6.2 KAROTENOIDI

Karotenoidi su biljni pigmenti koji se nalaze u plastidima te su najosjetljiviji na svjetlost valne duljine u plavo-ljubičastom spektru boje, odnosno 650 - 700 nm valne duljine svjetlosti. Oni su također zaslužni za proces fotosinteze i apsorbiraju energetski bogatu svjetlost u plavom i ljubičastom dijelu spektra te ju prenose na druge pigmente do klorofila a koji apsorbira svjetlost u crvenom dijelu spektra. Najvažniji karotenoidi u biljkama su crveno-narančasti izoprenoid β-karoten i žuti ksantofil lutein (Grabowski i sur. 2001).

Karotenoidi su podjeljeni na dvije skupine, karotene i ksantofile, a obje skupine su poželjne u konzumaciji u ljudskoj prehrani. Smatra se da su obje skupine važni antioksidansi i spojevi važni u biokemijskim reakcijama tijela. Skupine karotenoida se razlikuju vrlo malo, jedina razlika jest na završetku molekule koja kod ksantofila može imati hidroksilnu OH skupinu (Delgado-Vargas i sur., 2000).

### 2.6.3. PUČI

U biljkama kojima je turgor velik odnos između otvorenosti puči i intenziteta fotosinteze je blizak. Puči imaju stanice zapornice i stanice susjedice, a ovisno o biljnoj vrsti stanice su različitog izgleda. Zajednički rad koji se temelji na hidrostatskim silama unutar stanica zapornica i stanica susjedica omogućava otvaranje i zatvaranje puči ( Denffer i Ziegler, 1988.).

Njihova otvorenost i brojnost su usko povezane sa turgorom odnosno količinom vode koja se nalazi u biljci i koja je biljci u tom trenutku dostupna, a veliku ulogu ima i izmjena dana i noći odnosno količina svjetla. Ujutro kada je dovoljno svjetla i vode na raspolaganju puči su otvorene te je fotosinteza intenzivna, kroz noć, dok sunčeve svjetlosti nema, puči su zatvorene kako bi se smanjila evaporacija i gubitak vode.

Količina puči ovisi o fotosintetskoj aktivnosti biljke te ih kod onih biljaka koje imaju veći sadržaj klorofila ima više no kod biljaka sa manje klorofila ( Magyar-Tabori i

sur., 2010.). Reakcija puči može biti uzrokovana svjetlom pa se naziva fotonastijska ili uzrokovana količinom vode pa se naziva hidronastijska, ali samo gibanje puči je uzrokovano razlikom turgora u stanicama zapornicama i susjedica. Prema mjestu rasporeda puči možemo razlikovati epistomatske puči koje se nalaze isključivo na licu lista, hipostomatske puči koje se nalaze isključivo na naličju lista i amfistomatske puči koje se nalaze na licu i na naličju lista (Pevalek-Kozlina, 2003).

# 3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

## 3.1. BILJNI MATERIJAL

Kao biljni materijal korišteni su mikropropagirani uniformni izdanci jabuke sorte Gala koji su uzgojeni u Biotehnološkom laboratoriju Zavoda za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku, Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Prije postavljanja ovog pokusa izdanci su mikropropagirani na MS mediju dodatkom 0,6 mg/L meta-topolina (mT).

## 3.2. TRETMAN CITOKININIMA

Radi usporedbe utjecaja citokinina na mikropropagaciju, mikropropagirani izdanci jabuke sorte Gala veličine 1 – 1,5 cm postavljeni su na 2 medija: (1) MS (makro i mikro elementi), MS vitamini, 0,1 g/L inozitola, 30 g/L saharoze i 1,5 mg/L mT; (2) medij identičnog sastava, ali s dodatkom 1,5 mg/L BAP-a umjesto mT. pH medija je prilagođen na 5.8, nakon čega je dodano 8g/L Bacto agara (Difco). Sterilizacija hranidbenih medija je provedena u autoklavu na 121 °C, 25 minuta pri tlaku od 1 bar. Nakon toga je sterilizirani medij izliven u također sterilizirane Magenta posudice.

## 3.3. ZAKORJENJIVANJE IZDANAKA

Nakon četiri tjedna na hranidbenim medijima za mikropropagaciju, izdanci su supkultivirani na medij za zakorjenjivanje u staklene epruvete pri čemu je svaki izdanak bio smješten u zasebnu epruvetu. Utjecaj prethodnog medija je praćen na način da je sa oba tetmana citokininima na zakorjenjivanje postavljeno 30 izdanka pojedinačno, u epruvete. Nakon 8 tjedana procjenjen je udio zakorjenjenih biljaka. Sastav medija za zakorjenjivanje: MS (makro i mikro elementi), MS vitamini, 0,1 g/L inozitola, 30 g/L saharoze i 2 mg/L indolil-3 octene kiseline (IAA). pH medija je prilagođen na 5.8, nakon čega je dodano 8g/L Bacto agara (Difco). Sterilizacija hranidbenih medija je provedena u autoklavu kako je ranije opisano.

## 3.4. UVJETI U KOMORI RASTA

Razvoj i multiplikacija izdanaka te zakorjenjivanje se odvijalo u komori rasta. Uvjeti u komori su bili: temperatura od 23,5 ±1 °C, fotoperiod od 16 sati dan i 8 sati noć. Umjetno osvjetljenje osigurano je pomoću fluorescentnih cijevi Osram L 36W/77 FLUORA dok je intenzitet svjetla 40 μE $m^{-2}s^{-1}$.

## 3.5. ANALIZA GLAVNIH SASTAVNICA LISTA MIKROPROPAGIRANIH IZDANAKA

Četiri tjedna nakon postavljanja izdanaka na medije za mikropropagaciju (tretmani citokininima) procjenjen je razvoj izdanaka mjerenjem lisne površine, duljine i širine lista korištenjem Winfolio® softvera (WinFolio 2015 Pro., Regent Instru-ments Canada Inc.).

## 3.6. MJERENJE KONCENTRACIJE KLOROFILA I KAROTENOIDA

Četiri tjedna nakon postavljanja izdanaka na medije za mikropropagaciju (tretmani citokininima), na uzorku od tri izdanka sa svakog tretmana je određena koncentracija klorofila i karotenoida. Po 100 mg lisnog tkiva korišteno je za pripremu uzoraka za analizu klorofila. Uzorci lista su zdrobljeni u tarioniku s natrijevim karbonatom i postupno dodavanje 100% acetona (4,5 ml). Nakon što je dobivena jednolična smjesa, do obezbojenja je miješano na magnetnoj mješalici. Ovakvi uzorci su centrifugrani do odvajanja taloga, a tekuća faza je odpipetirana je u kivete zbog spektrofotometrijske analize na 470, 645 i 663 nm po metodi Inskeep i Bloom (1985). Dobiveni rezultati preračunati su u mg/g svježe tvari.

## 3.7. BROJ PUČI PO JEDINICI LISNE POVRŠINE

Sa svakog tretmana je nasumično uzeto 3 biljke odnosno ukupno 6 biljaka te se određivala gustoća puči po načelu broj puči po $mm^2$ površine lista.

## 3.8 PLAN POKUSA I ANALIZA PODATAKA

Zbog utvrđivanja utjecaja količine različitih citokinina i svjetla na uspješnost ukorijenjivanja, na svaki tretman postavljeno je 7 Magenta posuda, s 4 izdanka u svakoj, odnosno ukupno 28 biljaka po tretmanu nakon čega je procijenjen i uspoređen broj i veličina izdanaka na tretmanima te broj puči po jedinici lisne površine, koncentracija klorofila i karotenoida. Listovi biljaka s tretmana citokininima su fotografirani te su fotografije analizirane pomoću WinFolia® softvera. Za određivanje gustoće puči korišteno je 6 izdanaka sa svakog tretmana, dok je po tri izdanka sa svakog tretmana korišteno za pripremu uzoraka za analizu klorofila. Podaci jednofaktorijelnih pokusa podvrgnuti su jednosmjernoj analizi varijance (ANOVA).

# 4. REZULTATI I RASPRAVA

## 4.1.REZULTATI ANALIZE DULJINE MIKROPROPAGIRANIH IZDANAKA I STOPE MULTIPLIKACIJE

Prema rezultatima ovog istraživanja vidljiva je značajna ovisnost duljine mikropropagiranih izdanaka jabuke sorte Gala i vrste citokinina u hranidbenoj podlozi (Tablica 4.1.). Izdanci mikropropagirani na hranidbenoj podlozi koja je sadržavala citokinin metaTopolin (mT) prosječno su bili dulji od izdanaka koji su mikropropagirani na hranidbenoj podlozi koja je sadržavala citokinin 6-benzilaminopurin (BAP) dok je stopa multiplikacije značajno viša na hranidbenoj podlozi koja sadržava BAP od one koja je dobivena za biljke na hranidbenoj podlozi koja sadržava citokinin mT.

Tablica 4.1. ovisnost duljine izdanka i stopi multiplikacije o citokininu

| | **BAP** | **mT** |
|---|---|---|
| **Duljina izdanaka (mm)** | 12,154 B | 17,33 A |
| **Stopa multiplikacije (mm)** | 4,33 A | 1,71 B |

Pregledom literature očekivani rezultat je bio da će izdanci mikropropagirani na mT biti dulji od izdanaka mikropropagiranih na BAP-u. Prema Prerostova i sur. (2018) koji su proveli istraživanje o negativnim posljedicama BAP-a u odnosu na mT, izdanci mikropropagirani na mT ne bi trebali imati inhibirani rast izdanaka jer se citokinin mT ne akumulira u biljci. Ovim istraživanjem taj zaključak je potvrđen. Bairu i sur. (2007.) navode kako se veća inhibicija rasta izdanaka primjećuje kako se povećava koncentracija citokinina BAP-a. Ovi autori nisu mjerili dužinu izdanaka već su njihovu razvijenost pratili mjerenjem mase svježe tvari. Pri koncentracijama citokinina od 5 i

7,5 µM što je usporedivo s konentracijom citokinina korištenom u ovom (1,5 mg/l), veća masa svježe tvari izdanaka razvijena je na mediju s dodatkom mT. Rezultati ovog istraživanja poklapaju se s već provedenim istraživanjima o inhibiciji rasta izdanaka na mediju s dodatkom BAP-a u odnosu na izdanke razvijene na mediju s dodatkom mT-a.

Stopa multiplikacije u ovom istraživanju bila je značajno veća na mediju s dodatkom BAP-a u odnosu na medij s dodatkom mT-a što je u suprotnosti s istraživanjem Bairu i sur. (2007.) kod kojih je stopa multiplikacije izdanaka *Aloe polyphylla* bila neznatno veća na mediju s dodatkom 5 µM mT u odnosu na ekvivalentnu količinu BAP-a. Prema ovim autorima, superiornost mT odnosu na BAP u pozitivnom utjecaju na multiplikaciju izdanaka očitija je kod većih koncentracija (7,5 i 15 µM). Međutim, kod ovih koncentracija citokinina povećava se i udio hiperhidriranih izdanaka, pa autori upotrebu tako visokih koncentracija ne preporučuju.

## 4.2. REZULTATI MJERENJA KONCENTRACIJE FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

U tablici 4.2. vidljivi su rezultati mjerenja koncentracije klorofila a, b, njihovog međusobnog omjera te koncentracija karotenoida. Prema dobivenim rezultatima za niti jedno svojstvo nema statistički značajnijih razlika s obzirom na tretmane citokininima.

Tablica 4.2. količina klorofila s obzirom na tretman citokininom

| | BAP | mT |
|---|---|---|
| **Klorofil A (mg/g)** | 1,2 A | 1,16 A |
| **Klorofil B (mg/g)** | 0,6 A | 0,36 A |
| **Klorofil ukupni** | 1,56 A | 1,52 A |
| **Omjer klorofil A/ klorofil B** | 3,33 A | 3,35 A |
| **Karotenoidi (mg/g)** | 8,9 A | 8,1 A |

Dobiveni rezultati razlikuju se od rezultata istraživanja Dobránszki i sur. (2014.) u kojem je zabilježen utjecaj citokinina na sadržaj i omjer klorofila u listovima. Autori navode da je koncentracija klorofila u listovima izdanaka razvijenih na mediju s 6 µM BAP-a bila značajno veća od one izmjerene na mediju s ekvivalentnom količinom mT. U našem istraživanju su vrijednosti koncentracije klorofila (klorofil a, klorofil b, ukupni klorofil) izmjerenih na izdancima razvijenim na mediju s dodatkom BAP-a bile veće od onih izmjerenih na mediju s dodatkom mT, međutim razlike nisu bile statistički značajne.

## 4.3 REZULTATI ANALIZE GLAVNIH MORFOMETRIJSKIH PARAMETARA LISTA

Izmjere svih sastavnica lista (lisne površine, duljine i širine lista) statistički su veće na izdancima razvijenim na hranidbenoj podlozi s dodatkom metatopolina u odnosu na izdanke razvijene na podlozi s dodatkom benzilaminopurina (Tablica 4.3.).

Tablica 4.3. Rezultati analize glavnih sastavnica lista izdanaka mikropropagiranih na medijima s benzilanminopurinom i metatopolinom

| | BAP | mT |
|---|---|---|
| **Lisna površina pojedinog lista ($cm^2$)** | 0,159 B | 0,303 A |
| **Ukupna lisna površina po biljci ($cm^2$)** | 1,33 B | 2,88 A |
| **Duljina pojedinog lista (cm)** | 0,644 B | 1,099 A |
| **Širina pojedinog lista (cm)** | 0,578 B | 0,87 A |

Prema Ward i Leyser, (2004.) količina i broj izdanaka te razvijenost istih kao i broj i razvijenost listova na izdancima direktno je pod kontrolom citokinina i u interakciji sa auksinima. Prema njihovom istraživanju najveću ulogu u razvoju izdanaka imaju tip i koncentracija citokinina. U većini provedenih istraživanja koncentracije citokinina se kreću između 0.5 i 2 mg/l. Baraldi i sur (1991.) koristili su koncentraciju od 1 mg/l BAP, Dobránszki i sur. (2000.) koriste koncentraciju od 1.5 i 2 mg/l, dok Sharma i sur. (2000.) koriste koncentracije od 0.5 i 2 mg/l i zaključuju da se u navedenim koncentracijama citokinina BAP-a u podlogama primjećuje dobra razvijenosti izdanaka i listova. Marin i sur. (1993.) u istraživanju utjecaja koncentracije citokinina na razvijenost izdanaka dokazali su da su se koncentracije citokinina mT od 0.5 do 5.0 mg/l dokazale kao puno bolje u razvoju izdanaka i količini listova u odnosu na iste koncentracije citokinina BAP, što je potvrdilo i ovo istraživanje.

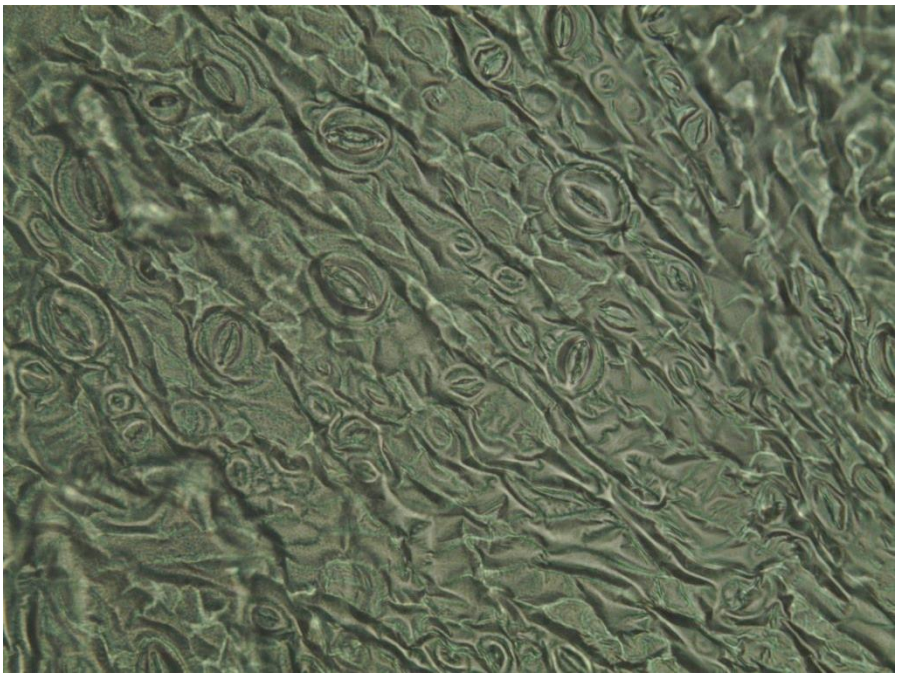
## 4.4 BROJ PUČI PO JEDINICI LISNE POVRŠINE

Prosječan broj puči na listovima izdanka ne razlikuje se značajno među izdancima razvijenim na podlozi s dodatkom BAP i mT (Tablica 4.4.).

Tablica 4.4. broj puči po $mm^2$ ovisno o tretmanu citokininom

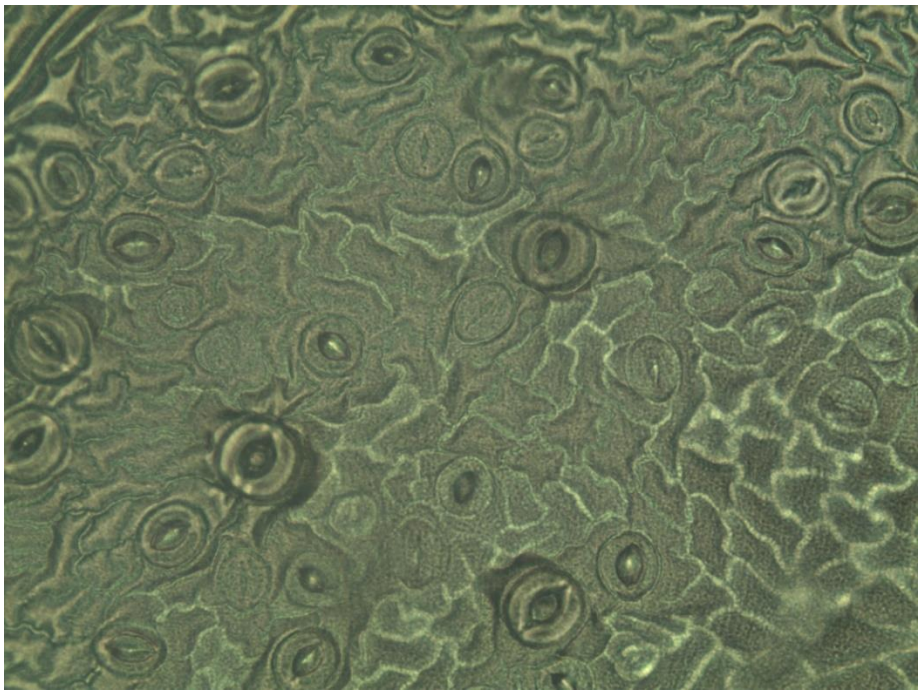
| Citokinin | Broj puči po jedinici lisne površine |
|---|---|
| **BAP** | 464,0 A |
| **mT** | 500,8 A |

Taj rezultat poklapa se sa istraživanjem koje su proveli Magyar-Tabori i sur. (2010.) u kojem je zaključeno da je veći broj puči kod biljaka koje imaju veću koncentraciju klorofila, a time i veću fotosintetsku aktivnost. S obzirom da je u ovom istraživanju rezultat klorofila u oba tretmana biljaka jednak, broj puči je sukladan tim rezultatima. Slika 4.1., Slika 4.2., Slika 4.3., i Slika 4.4. prikazuju otvorene i zatvorene puči biljaka s različitih tretmana citokininima.



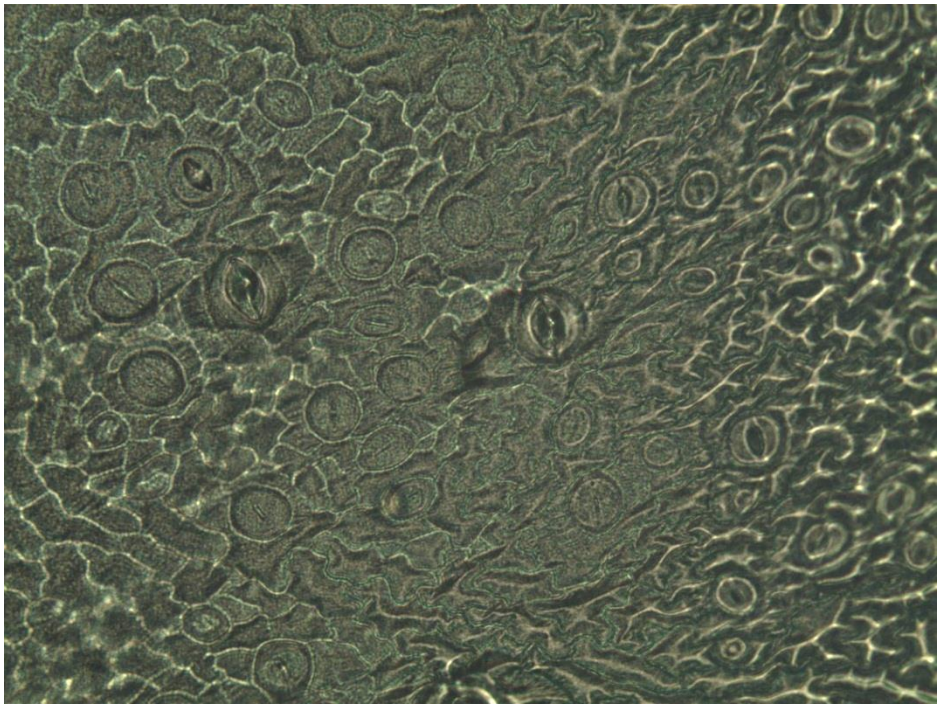
Slika 4.1.. Puči biljke mikropropagirane na citokininu BAP

fotografiju snimila izv. prof. dr.sc. Tatjana Prebeg



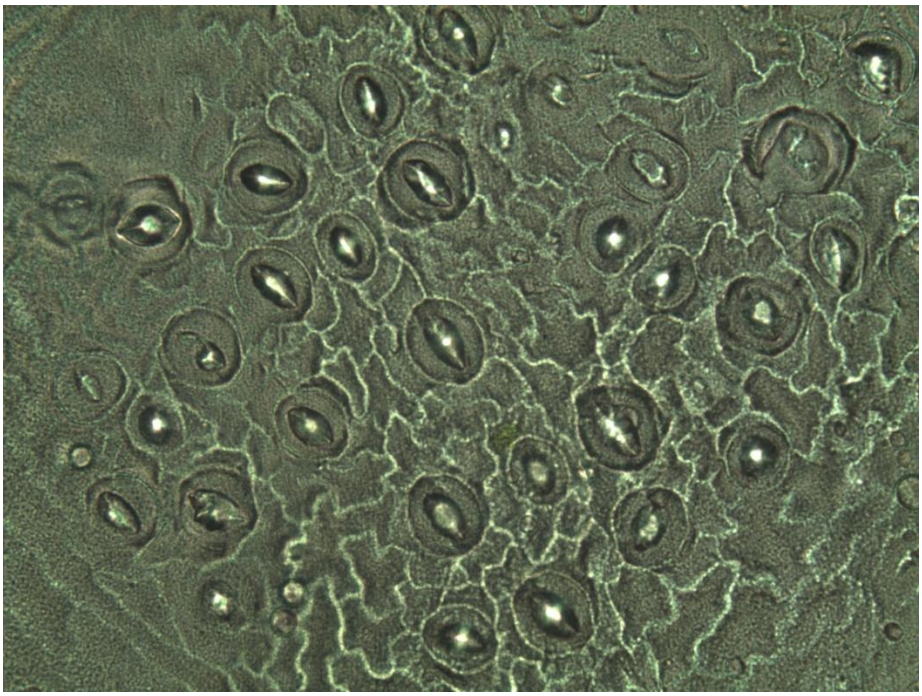
Slika 4.2. Puči biljke mikropropagirane na citokininu BAP

fotografiju snimila izv. prof. dr.sc. Tatjana Prebeg



Slika 4.3. Puči biljke mikropropagirane na citokininu mT

fotografiju snimila izv. prof. dr.sc. Tatjana Prebeg



Slika 4.4. Puči biljke mikropropagirane na mT

fotografiju snimila izv. prof. dr.sc. Tatjana Prebeg

## 4.5 USPJEŠNOST ZAKORJENJIVANJA

Rezultati uspješnosti zakorjenjivanja izraženi su u postotcima te obzirom na post efekt korištenog citokinina u fazi multiplikacije izdanaka. Statistički je značajno veća uspješnost zakorjenjivanja izdanaka koji potječu s hranidbene podloge s dodatkom BAP-a (Tablica 4.5.).

Tablica 4.5. Postotak zakorjenjenih biljaka ovisno o tretmanu citokininom

| | **BAP** | **mT** |
|---|---|---|
| **% zakorjenjenih biljaka** | 57 A | 16 B |

Ovaj rezultat dobiven istraživanjem je suprotan od rezultata zakorjenjivanja pronađenih u literaturi prema kojima su biljke mikropropagirane na mT imale veći postotak zakorjenjivanja od biljaka mikropropagiranih na BAP-u. Podlešáková i sur. (2012.) su u istraživanju dobili rezultat da pri koncentracijama u kojima BAP inhibira

zakorjenjivanje mT nadoknađuje inhibiciju te povećava postotak zakorjenjivanja. Međutim, Muhammad i sur. (2007.) u istraživanju s koncentracijama BAP-a u hranidbenoj podlozi zaključili su da BAP pri nižim koncentracijama (do 2 mg/l) ne inhibira rast korijenja banane dok na većim koncentracijama ima negativan učinak na zakorjenjivanje što je u skladu s rezultatima ovog israživanja.

# 5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja o utjecaju citokinina na stopu multiplikacije, duljinu izdanaka, razvoj lisne površine, , količinu klorofila, postotak zakorjenjivanja te broj puči po jedinici lisne površine kod jabuke sorte Gala donijeti su slijedeći zaključci:

- Stopa multiplikacije značajno je veća na hranidbenoj podlozi s dodatkom benzilaminopurina dok je duljina izdanka veća pri dodatku metatopolina.

- Biljke mikropropagirane na mT bile su veće i razvijenije što je rezultiralo i većom lisnom površinom.
    - Količina klorofila a i b te njihov omjer kao i količina karotenoida u izdancima mikropropagiranima na metatopolinu nije se značajno razlikovala od izdanaka mikropropagiranih na benzilaminopurinu. Broj puči po jedinici lisne površine kod biljaka mikropropagiranih na hranidbenoj podlozi s dodatkom benzilaminopurina nije se značajno razlikovao od broja puči po jedinici lisne površine biljaka mikropropagiranih na hranidbenoj podlozi s dodatkom metatopolina.

      Postotak zakorjenjenih biljaka koje su mikropropagirane na hranidbenoj podlozi s metatopolinom značajno je niži od postotka zakorjenjenih biljaka mikropropagiranih na benzilaminopurinu.

Ukupno gledajući, rezultati provedenog istraživanja upućuju na to da je mT kao citokinin u hranidbenoj podlozi u pozitivnoj koleraciji sa rastom i razvojem izdanaka, dok na koncentraciju klorofila u listu biljaka i broj puči po jedinici lisne površine nema toliki utjecaj. Zakorjenjivanje biljaka u provedenom istraživanju bolje je kod biljaka mikropropagiranih na hranidbenoj podlozi sa dodatkom benzilaminopurina pa se ne može tvrditi da je mT kao citokinin superiorniji od benzilaminopurina u korištenoj koncentraciji što se tiče post-efekta u fazi zakorjenjivanja biljaka. S obzirom da je korištena jedna koncentracija u hranidbenoj podlozi, različite koncentracije mogu dati drugačije rezultate.

# 6. LITERATURA


1. Adeyemi O. Aremu, Michael W. Bairu, Lucie Szüčová, Jeffrey F. Finnie, Johannes Van Staden (2012) The role of meta-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated 'Williams' bananas, Journal of Plant Physiology, 169 (15):1530-1541

2. Auer, C.A., (1996) Cytokinin inhibition of Arabidopsis root growth: Anexamination of genotype, cytokinin activity, and N-6-benzyladenine metabolism. J Plant Growth Regul, 15: 201–206

3. Bairu, M.W., Stirk, W.A., Doležal, K., Van Staden, J., (2007) Optimizing the micropropagation protocol for the endangered Aloe polyphylla: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? Plant Cell Tissue Organ Cult 90:15–23

4. Baraldi, R., Fasolo Fabbri Malavasi, F., Predieri, S., Castagneto, M., (1991.) Effect of potassium humate on apple cv. 'Golden Delicious' cultured in vitro. Plant Cell Tissue Org Cult, 24:187–91.

5. Bašić, I., (2017).Stari hrvatski voćnjaci i sorte jabuka. Leo-commerce, Rijeka

6. Cheng, T.Y., (1978.) Propagating woody plants through tissue culture. Am Nurseryman, 7-14.

7. Delgado-Vargas F., Jimenez AR., Paredes-Lopez O., (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-- characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Crit Rev Food Sci Nutr, 40 (3):173-289.

8. Denffer, D., Ziegler, H., (1988) Botanika. Morfologija bilja i fiziologija. Školska knjiga, Zagreb

9. Dobránszki, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tábori, K., Jámbor-Benczúr, E., Bubán, T., Szalai, J., (2000.) In vitro shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinins and auxin. Int J Hortic Sci, 6:36–9.

10. Dobránszki, J., Mendler-Drienyovszki, N. (2014), Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves, Journal of Plant Physiology, 171 (16):1472-1478.

11. Dobránszki, J., Mendler-Drienyovszki, N., (2014.) Journal of Plant Physiology 171: 1472–1478

12. Dubravec KD. (1996). Botanika. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

13. Godet, J. ( 2000). Drveće i grmlje. Naklada C, Zagreb

14. Grabowski, B., Cunningham, F. X., Gantt, E., (2001.). Chlorophyll and carotenoid binding in a simple red algal light-harvesting complex crosses phylogenetic lines. Proc Natl Acad Sci USA, 98 (5): 299111-2916.

15. Hass, H., (2008). Rezidba voćaka. Mozaik knjiga, Zagreb

16. Jelaska S. (1994). Kultura biljnih stanica i tkiva: temeljna istraživanja i primjena. Zagreb, Školska knjiga.

17. Kantoci, D. (2006). Voćarstvo. Pregledni rad. (preuzeto sa https://hrcak.srce.hr/164219 hrcak.srce.hr, 27.07.2019.,13:00)

18. Krpina, I. i suradnici., (2004). Voćarstvo. Nakladi zavod Globus, Zagreb

19. Magyar-Tabori, M., Dobranszki, J., Teixeira da Silva, J.A., Bulley, S.M., Hudak, I., (2010.) The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple, Plant Cell Tiss Organ Cult,101:251–267

20. Marin, J.A., Jones, O.P., Hadlow, W.C.C., (1993) Micropropagation of columnar apple trees. J Hortic Sci, 68:289–97.

21. Muhammad, A., Rashid, H., Hussain, I., ( 2007.) Proliferation-rate effects of BAP and kinetin on banana (Musa spp. AAA Group) 'Basrai'. HortScience, 42:1253-5

22. Murashige T., Skoog F. (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". Physiologia Plantarum. 15 (3): 473–497.

23. Pevalek-Kozlina, B.( 2003). Fiziologija bilja. Profil, Zagreb

24. Plíhal, O., Szüčová, L., Galuszka, P., (2013.) N9-substituted aromatic cytokinins with negligible side effects on root development are an emerging tool for in vitro culturing. Plant Signaling & Behavior, 8:6, e24392

25. Podlešáková K., Zalabák D., Čudejková M., Plíhal O., Szüčová L., Doležal K., Spíchal L. (2012) Novel Cytokinin Derivatives Do Not Show Negative Effects on Root Growth and Proliferation in Submicromolar Range. PLoS ONE 7(6):11

26. Podlešáková, K., Zalabák, D., Cudejková, M., Plíhal, O., Szücová, L., Doležal, K., (2012.) Novel cytokinin derivatives do not show negative effects on root growth and proliferation in submicromolar range. PLoS ONE 2012; 7:e39293; PMID:22723989

27. Prerostova, S., Dobrev, PI., Gaudinova, A., Knirsch, V., Körber, N., Pieruschka, R., Fiorani, F., Brzobohatý, B., Cerný, M., Spichal, L., Humplik, J., Vanek, T., Schurr, U., Vankova, R. (2018), Cytokinins: Their Impact on Molecular and Growth Responses toDrought Stress and Recovery in Arabidopsis, Frontiers in Plant Science, 9:655

28. Quorin, M., Lepoivre, P., (1977.) Improved media for in vitro culture of Prunus sp. Acta Hortic, 78:437–42.

29. Sharma, M., Modgil, M., Sharma, D.R., (2000.) Successful propagation in vitro of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. Indian J Exp Biol, 38:1236–40.

30. Ward, S.P., Leyser, O., (2004.) Shoot branching. Curr Opin Plant Biol, 7:73–8.

31. Werbrouck, S.P.O., (2010). Merits and drawbacks of new aromatic cytokinins in plant tissue culture. Acta Hortic. 865, 103–108.

32. Werbrouck, S.P.O., van der Jeugt, B., Dewitte, W., Prinsen, E., van Onckelen, HA., (1995) The metabolism of benzyladenine in Spathiphyllum floribundum 'SchottPetite' in relation to acclimatisation problems. Plant Cell Rep, 14: 662–665.

**izvori s web-stranica**:

https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list (pristupljeno: 21.07.2019., 15:00)

https://www.savjetodavna.hr/ ( pristupljeno 18. 09. 2019., 12:00)

# 7. ŽIVOTOPIS

Ana Petrović rođena je u Zagrebu 29.01.1995. godine, a od rođenja živi u Velikoj Gorici. 2001. godine kreće u prvi razred Osnovne škole Eugen Kumičić u Velikoj Gorici, a 2009. godine završava osnovnoškolsko obrazovanje. Iste godine upisuje Opću gimnaziju Velika Gorica te je maturirala u lipnju 2013. godine. Na jesen 2013. godine počinje pohađati Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i 2016. godine završava preddiplomski studij biljnih znanosti i time stječe naziv sveučilišna prvostupnica inženjerka biljnih znanosti. Iste godine upisuje diplomski studij biljnih znanosti na kojem studira do danas. Tečno koristi engleski jezik u jeziku i pismu, a talijanski jezik završila je na B1 razini. Kroz cijelo vrijeme studiranja radi preko student servisa. U slobodno vrijeme voli druženje sa prijateljima, gledanje filmova i rekreiranje.