Uspješnost zakorjenjivanja jabuke sorte Gala ovisno o predtretmanu citokininima

Jurić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:889946

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

USPJEŠNOST ZAKORJENJIVANJA JABUKE SORTE GALA OVISNO O PREDTRETMANU CITOKININIMA

DIPLOMSKI RAD

Matea Jurić

Zagreb, rujan 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij

Biljne znanosti

The effect of cytokinin pretreatment on rooting success of Gala apple variety

DIPLOMSKI RAD

Matea Jurić

Mentorica: doc. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović

Zagreb, rujan 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Matea Jurić**, JMBAG 0178122784, rođena 10.05.1997. u Zagrebu,

izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

USPJEŠNOST ZAKORJENJIVANJA JABUKE SORTE GALA OVISNO O PREDTRETMANU CITOKININIMA

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

USPJEŠNOST ZAKORJENJIVANJA JABUKE SORTE GALA OVISNO O PREDTRETMANU CITOKININIMA

Diplomski rad studentice **Matea Jurić**, JMBAG 0178122784, naslova

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana_____ .

Povjerenstvo: Potpisi:

1. Mentorica: doc. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović _____

2. Članica povjerenstva: prof. dr. sc. Snježana Kereša _____

3. Članica povjerenstva: doc. dr. sc. Ivanka Habuš Jerčić _____

Sažetak

Kroz ovaj rad ispitan je utjecaj citokinina na uspješnost zakorjenjivanja jabuke sorte Gala ovisno o predtretmanu citokininima. Upotreba citokinina nužna je u fazi multiplikacije izdanaka. Međutim rezidui citokinina mogu negativno utjecati na zakorjenjivanje izdanaka. S obzirom da je u dostupnoj literaturi poznato da se prirodni citokinin meta-topolin (mT) brže razgrađuje u biljnom tkivu u odnosu na češće korišten 6-benzilaminopurin (BAP) i ima manje negativnih utjecaja na razvoj korijenja i zakorjenjivanje, ovim istraživanjem pokazalo se suprotnim. Jedan od glavnih razloga velike primjene BAP-a u mikropropagaciji je zbog toga što je stabilniji u odnosu na ostale citokinine, teže oksidira uz pomoć svjetlosti i jeftiniji je. Zbog različitih nuspojava prilikom korištenja kao što su nekroza vrha izdanka, inhibicija zakorjenjivanja te teškoće prilikom aklimatizacije kao alternativna zamjena u literature se navodi meta-topolin.

U cilju procjene post-efekta citokinina na zakorjenjivanje jabuke sorte Gala, u ovom istraživanju izdanci jabuke sorte Gala su multiplicirani u *in vitro* uvjetima na medijima s dva različita regulatora rasta. Korišteni su citokinini BAP i mT s pet različitih koncentracija svaki. Nakon postignutog dovoljnog broja eksplantata na hranjivom mediju za multiplikaciju, izdanci jabuke postavljeni su na medij za zakorjenjivanje s auksinom Indol-3-maslačnom kiselinom (IBA) i na kontrolni medij. Izdanci razvijeni na podlozi sa mT bili su duži u odnosu na izdanke koji su razvijeni na podlozi sa BAP-om, ali su oni imali veći broj multipliciranih izdanaka u odnosu na mT. Nakon što su se izdanci zakorjenili procjenjena je uspješnost zakorjenjivanja s obzirom na prethodni medij gdje su korištene različite koncentracije BAP-a i mT-a. Zakorjenjivanje je bilo uspješnije na podlogama s dodatkom BAP-a kao i postotak aklimatiziranih biljaka.

Ključne riječi: citokinini, multiplikacija, zakorjenjivanje, aklimatizacija, 6-benzilaminopurin, meta-topolin

Summary

In this work, the influence of cytokinins on rooting success of Gala cultivar apple in dependence on pretreatment with cytokinins was studied. The use of cytokinins is necessary in the shoot multiplication phase. However, cytokinin residues may negatively affect shoot rooting. As it is known from the available literature that the natural cytokinin meta-topoline (mT) is degraded faster in plant tissues compared to the more commonly used 6-benzylaminopurine (BAP) and will have fewer negative effects on root development and rooting this study proved the opposite. One of the main reasons for the large application of BAP in micropropagation is that it is more stable compared to other cytokinins, it oxidizes more difficult with the help of light and it is cheaper and easier to obtain. Due to various side effects during use such as shoot tip necrosis, rooting inhibition and difficulty in acclimatization, meta-topoline is cited as an alternative in the literature.

In n this study to detect post-effect of cytokinins on rooting of Gala variety apple, shoots of Gala apples were first multiplied on medium with two different growth regulators. Cytokines BAP and mT were used at five different concentrations. After a sufficient number of explants were obtained on the nutrient medium for multiplication, apple shoots were placed on the rooting medium with auxin Indole-3-butyric acid (IBA) and on the control medium. The shoots were rooted on MS medium and the rooting success was evaluated with respect to the previous medium where different concentrations of BAP and mT were used.

Shoots that developed on media with addition of mT were much longer compared to shoots developed on media with BAP. However, higher number of multiplied shoots were developed on media containing BAP. Rooting as well as success of acclimatization were more successful in plants developed on media with the addition of BAP.

Keywords: cytokinins, multiplication, rooting, acclimatization, 6-benzylaminopurine, meta-topoline

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Cilj istraživanja 1
2. PREGLED LITERATURE 2
2.1 Morfološka obilježja jabuke 2
2.2 Povijest sorte Gala 3
2.2.1 Osobine sorte Gala 3
2.3 Kemijski sastav ploda i nutritivna vrijednost 5
2.3.1 Antioksidansi 5
2.3.2 Vitamini i minerali 5
2.3.3 Ugljikohidrati i vlakna 6
2.3.4 Fitokemikalije i flavonoidi 6
2.4 Agroekološki uvjeti i uzgoj 8
2.5 Razmnožavanje jabuke 9
2.5.1 Vegetativno razmnožavanje 9
2.5.2 Generativno razmnožavanje 9
3. MIKROPROPAGACIJA JABUKE 10
3.1 Tehnike i faze mikropropagacije 11
3.2 Regulatori rasta biljka 14
3.2.1 Citokinini 15
3.2.2 Citokinini u podlozi za mikropropagaciju jabuke 19
3.2.3 Utjecaj citokinina na stvaranje adventivnog korijenja 19
4. MATERIJALI I METODE 22
4.1 Biljni materijal 22
4.3 Autoklaviranje i sterilizacija instrumenata 22
4.4 Rad u laminaru 22
4.5 Početni tretman umnažanja izdanaka jabuke 22
4.6 Uvjeti u komori rasta 23
4.7 Multiplikacija biljnog materijala na medijima s različitim koncentracijama citokinina 6-benzilaminopurina i meta-topolina 23
4.8 Zakorjenjivanje izdanaka 25

4.9. Aklimatizacija zakorjenjenih biljaka 26
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA 27
5.1 Uspješnost multiplikacije ovisno o citokininima 27
5.2 Utjecaj predtretmana citokinina na uspješnost zakorjenjivanja izdanaka i karakteristike korijena zakorjenjenih biljaka 32
5.3.1 Utjecaj citokinina i tretmana za zakorjenjivanje na karakteristike korijena zakorjenjenih biljaka 38
5.4 Aklimatizacija 40
6. ZAKLJUČAK 42
7. LITERATURA 43
8. ŽIVOTOPIS 45

1. UVOD

Jabuka je jedna od najčešće uzgajanih voćnih vrsta na svijetu i pripada porodici ruža. Danas se u svijetu uzgaja oko 10000 različitih sorti (Krpina, 2004), a jedna od njih je i Gala. Zemlja porijekla sorte Gala je Novi Zeland, a sorta je nastala 1957. križanjem sorti Kidd's Orange Red x Golden Delicious (Krpina, 2004). Ova sorta ima izrazito veliku kvalitetu plodova i zbog toga se najčešće koristi u industrijskim nasadima. Plodovi jabuke sadrže velike količine vitamina, minerala, ugljikohidrata, organskih kiselina itd. Jedna od glavnih karakteristika ove sorte, a što je razlikuje u odnosu na druge sorte je ta što stari izdanci i jednogodišnji izdanci najčešće urode plodom (Bašić, 2017). Jabuka ima mogućnost vegetativnog i generativnog razmnožavanja, ali danas se uglavnom za podizanje nasada koristi vegetativno razmnožavanje koje može biti pomoću reznica ili mikropropagacijom u *in vitro* uvjetima. Upravo tu tehniku smo primjenjivali u ovome istraživanju. Sam pojam mikropropagacije podrazumijeva bilo koji način razmnožavanja biljaka koje se nalaze u *in vitro* uvjetima (Parađiković, 2014). Kao eksplantati uglavnom se koriste apikalni meristemi koji moraju imati najmanje dvije primordije lista, jer se bez njih ne mogu dovoljno razviti, a to može dovesti do stvaranja nediferenciranog kalusnog tkiva (Teixeira da Silva i sur., 2019). Jedna od glavnih komponenti uspješnog rasta, razvoja i zakorjenjivanja biljaka jesu upravo citokinini. Glavno mjesto nastanka citokinina je vršni meristem korijena. Glavni putevi nastanka citokinina su kondenzacija adenina s odgovarajućim davateljem N6 supstituenta gdje dolazi do modifikacije na šestom ugljikovom atomu. Poznato je da kod većine fitohormona prisutan bazipetalan prijenos, dok je kod citokinina akropetalan prijenos tj. prijenos ksilemom. Citokinini imaju velik utjecaj na biljku kao što je prijenos organskih tvari iz različitih dijelova biljke prema mladim listovima i plodovima, sprečavanju starenje lista, reguliraju dotok hranjiva u biljku. Dakle, iako imaju velik broj pozitivnih djelovanja isto tako mogu imati i negativan utjecaj na biljku kao što je inhibicija diobe stanica, smanjivanje dotoka hranjiva prema mladim listovima, što dovodi do zadebljanja i skraćivanja primarnog korijena, te oslabljeno bočno grananje korijena (Plíhal i sur., 2013). Iz ovoga zaključujemo da su citokinini neophodni hormonski sastojci u hranjivoj podlozi za uzgoj izoliranih biljnih stanica u kulturi tkiva i promociji diobe stanica. Danas je jedan od najkorišteniji citokinina 6-benzilamino purin (BAP) zbog svoje visoke bioaktivnosti i niske cijene. Nakon velikog broja istraživanja utvrđeno je da BAP dovodi do inhibicije korijena ako se koristi u nešto većim količinama (Souza i sur., 2019). Meta-topolin (mT) je aromatski citokinin koji ima vrlo sličan mehanizam kao i BAP samo on u većim koncentracijama u odnosu na BAP ne uzrokuje inhibiciju korijena (Werbrouck, 2010.).

1.1.Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je procijeniti utjecaj post-efekta citokinina 6-benzilaminopurina i meta-topolina u različitim koncentracijama na zakorijenjivanje izdanaka jabuke sorte Gala.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Morfološka obilježja jabuke

Jabuka (*Malus domestica*) pripada porodici ruža i listopadnom drveću koje najčešće naraste od 1,8 metara do 4,6 metra, a može narasti čak do 12 metara. Predstavlja jedno od najvažnijih plodova u umjerenim zonama i treća je najvažnija voćna kultura (64,3 milijuna t/godišnje) na svijetu (Dobránszki i sur., 2010). Jabuke kakve danas poznajemo potječu iz Središnje Azije, odakle su preko Perzije prenesene u Europu. Domaća jabuka *Malus domestica* Borkh je križanac koji je nastao od nekoliko vrsta roda *Malus,* a to su *Malus sylvestris, Malus roemer, Malus orientalis, Malus sieversii, Malus baccata* (Miljković, 1991). Jabuci najbolje odgovara umjereno kontinentalna klima sa srednjim godišnjim temperaturama od 8 do 12°C . Od voćnih vrsta jabuka ima najmanje zahtjeve za toplinu. Dobro podnosi hladne zime, gdje apsolutna minimalna temperatura ne pada ispod -25 °C (Miljković, 1991). Krošnja kod jabuke je uglavnom razgranata, gusta i široka, a deblo može biti različitog promjera, međutim zabilježeno je da može dostići i do jedan metar u promjeru. Kora je ovisno o sorti i klimi u kojoj se uzgaja različita 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 nešto veći i jajoliki dok su postrani pupovi manji i dosta polegnuti uz granu. List se sastoji od rukavca, peteljke i plojke. Osim što list stvara hranjiva, izlučuje i vodu kroz sićušne puči na donjoj strani plojke (Miljković, 1991). Listovi su ovalnog oblika, naizmjenično poredani i jednostavni. Dugi su od 4 do 13 cm, a široki 3 – 7 cm, zeleno sjajnog i slabo dlakavog lica te sivo zelenog dlakavog naličja. Cvjetovi su dvospolni, pravilni, najčešće su promjera od 3 – 4 cm, imaju bijele latice koje se nalaze iznad kratkih lapova. Stapke cvjetova su dlakave i duge do 3 cm, a cvjetovi mogu rasti pojedinačno ili kao štitasti cvatovi s 4 – 5 cvijetova. 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 imati rozu boju prema krajevima. Središnji cvijet se naziva još i kraljevski. On se otvara prvi i iz njega se može razviti veći plod. Cvatnja najčešće traje do 20 dana, što znatno ovisi o uvjetima u kojima se nalazi od početka travnja do kraja travnja i početka svibnja. Ima jednu plodnicu i ona je podrasla s 4 do 5 sraslih plodnih listova dok prašnika ima mnogo više te se na vrhu nalaze žute prašnice (Godet, 2000). Jabuka je izrazito medonosna biljka i daje 15-50 kg meda/ha. Zahvaljujući dostignućima tehnologije čuvanja jabuke, danas potrošnja svježih plodova traje čitavu godinu. Sazrijeva od 5. do 20. rujna. Rano i obilno rodi (http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/vocarstvo/vocne-vrste/jabuka/jesenske-sorte-jabuke).

2.2 Povijest sorte Gala

Zemlja porijekla sorte Gala je Novi Zeland. Sorta je nastala 1957. križanjem sorti Kidd's Orange Red x Golden Delicious. Autor sorte je J. H. Kidd. Nakon što je dobiven prototip, ocjenjujući njegove ne baš izvanredne vanjske karakteristike, autor je preuzeo razvoj novih hibridnih vrsta u cilju poboljšanja kvalitete. U proizvodnji je od 1965. godine. Ova sorta predstavlja sjedinjenje tradicionalnog i modernog. Kao sorta osrednje je produktivna i uglavnom se koristi za plantažne nasade (http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/vocarstvo/vocne-vrste/jabuka/jesenske-sorte-jabuke)

Mutanti jabuke sorte Gala:

- Imerial Gala
- Royal Gala
- Regal Gala
- Galaxy

2.2.1 Osobine sorte Gala

Gala je diploidna sorta. Broj kromosoma koji se nalaze u somatskim stanicama je 34. Pripada stranooplodnim sortama. Srednje je bujna sorta, rano dolazi u rod i rađa redovito. Broj dana od cvatnje do berbe je oko 140-160. Srednje je podložna alternaciji. Po karakteristikama rasta je slična Golden Deliciousu. Osjetljiva je na fuzikladij. Dosta je otporna na niske zimske temperature. Dobro je oprašuju sorte Elstar, Crveni Delišes, Fuji, Zlatni Delišes i Granny Smith (http://www.psss.rs). Stablo kod ove sorte je srednje veličine. Visina mu je od 3 do 5 m. Korijenov sustav je iznimno moćan i vlaknastog tipa. Broj izdanaka je prosječan. Grane su smještene pod velikim kutom nagiba u odnosu na glavno deblo (80°). Skeletne grane su srednje čvrstoće. Za razliku od ostalih sorti, stari izdanci i jednogodišnji izdanci i izrasline urode plodom. Vanjski dio krošnje obojen je svijetlo zelenom bojom, a unutarnji je svjetlijeg tona i gusto izražen. Stablo jabuke ove sorte ulazi u fazu cvjetanja krajem svibnja - početkom lipnja, što potpuno može ukloniti mogućnost otpadanja plodnih pupova pod utjecajem mrazeva (Miljković, 1991). Cvjetovi su srednje veličine, obojeni u bijelo. Biljka počinje s rodom u šestoj godini, a patuljaste sorte u trećoj ili četvrtoj godini. Plodovi su srednje veličine. Dosežu masu do 150 g. Boja ploda ovisi od sorte, a može biti: zelena, žuta, žuto zelena i crvena. Plod kod jabuke nastaje iz plodnice i usplođa (Miljković, 1991). Vanjski jestivi dio ploda je bijele boje, dosta je sočan, kiselkast ili slatkast. Unutrašnjost ploda jabuke kod većine sorata je bijele boje, ali se može naći i plod s crvenkasto bijelim nijansama. Sjemenke su dugoljaste, smeđe ili crvenosmeđe boje (Miljković, 1991). Kora je sjajna. Voće je vrlo otporan na mehanička oštećenja i ima mogućnost dužeg zadržavanja svježine. Okus ploda je umjereno sladak i kiselkast (Miljković, 1991).

Plodovi se koriste za:

- Kuhanje i pečenje
- slastice
- sokove
- hranu za bebe

Glavne prednosti sorte:

- posjeduje izrazito dobre karakteristike koje omogućuju široku upotrebu ne samo u domaćinstvu, već i kao sirovine za preradu u industrijskim razmjerima
- ima visok i stabilan prinos
- dosta kasno cvjeta, što smanjuje rizik od propadanja pupova pod utjecajem niskih temeratura i kasnih mrazeva
- dobro je otporna na gljivične bolesti
- ima dugo razdoblje skladištenja usjeva

Glavni nedostatci sorte:

- ima veliku sklonost prema hiperproduktivnosti, što negativno može utjecati na veličinu ploda
- niska otpornost na moniliozu
- slaba otpornost prema dugotrajnim mrazevima



Slika 2.1. Plod jabuke Gala

(izvor: https://hr.farmcityday.com/1443-full-description-of-the-apple-variety-gala.html)

2.3 Kemijski sastav ploda i nutritivna vrijednost

Plod (Slika 2.1.) kod jabuke sorte Gala srednje je krupan, okrugao i čvrst. Meso je hrskavo, fine teksture, slatko i aromatično. Pokožica je žute boje s narančasto crvenom bojom kod standardnog tipa, ali kod nekih klonova može biti tamnije crvene boje (http://www.psss.rs). Plod jabuke je zacijelo najkompletnije voće u ljudskoj prehrani. Jabuka ima gotovo sve što ljudski organizam zahtjeva. Sadrži voćne šećere i voćne kiseline (jabučna, limunska, oksalna, jantarna), vitamine (B1, B2, C), minerale, sirova vlakna, pektine i čistu vodu koja se na putu od tla do ploda pročistila kroz milijune staničnih opni (Krpina, 2004). Jedna srednja jabuka teška je 155 g i ima 80 kalorija. Jedna od glavnih mjera prilikom uzgoja je kemijsko prorjeđivanje plodova kako bi se spriječilo dobivanje jako sitnih plodova. Glavni nedostatak ove sorte je veliki broj slabo obojenih plodova, a može doći i do pucanja plodova. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost ploda jabuke (Tablica 2.1.) variraju od sorte do sorte iako je kod većine kemijski sastav i nutritivna vrijednost među kultivarima sličan. U plodu se nalazi najviše vode kao i kod većine svježeg voća, a kreće se od 85% (Bašić, 2017). Poslije vode kemijski najzastupljeniji su ugljikohidrati sa 10 – 15 % što ovisi o sorti, dok su masti i proteini prisutni u vrlo malim količinama (također ovisi 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). Čvrstoća jabuka može se testirati držeći je na dlanu. Jabuka bi se trebala osjećati čvrsto i teško, a ne meko i lagano. Svježe jabuke Gala ne bi trebale imati tamna ili mekana mjesta. Kada se prelazi prstom po koži jabuke, koža se ne smije naborati. Nabiranje znači da jabuka nije dovoljno hladna ili da se jabuka predugo drži u hladnjači (https://hr.kenkosokushin.com/what-is-the-nutritional-value-of-a-gala-apple). Osobita ljekovitost jabuke pripisuje se jabučnom octu (smanjenje kolesterola, tjelesne težine i dr.) koji nastaje nakon vrenja plodova (Hulina, 2011).

2.3.1 Antioksidansi

Antioksidansi su kemikalije koje sprječavaju ili smanjuju oksidaciju oštećenja stanica i tkiva od slobodnih radikala koji se nalaze u tijelu. Jabuke i njihovi antioksidansi pomažu u smanjenju rizika od srčanih bolesti, dijabetesa i raka. Gala jabuke značajan je izvor ovih kemikalija koje se bore protiv slobodnih radikala.

2.3.2 Vitamini i minerali

Na temelju prehrane od 2000 kalorija dnevno, jedna srednja jabuka Gala može opskrbiti s 8% preporučene dnevne vrijednosti vitamina C. Ista mala jabuka može pružiti 2% dnevnih potreba za željezom i vitaminom A. Gala također sadrži 5% kalija koji je potreban tijelu da bi bilo zdravo.

2.3.3 Ugljikohidrati i vlakna

Ugljikohidrati prisutni u jabuci su jednostavni šećeri tj. monosaharidi i disaharidi. Prirodno vlakno koje se nalazi u Gala jabuci je pektin. Jabuke posjeduju više pektina nego bilo koje drugo voće. Jabuke su izvor i složenih i jednostavnih ugljikohidrata. Jedna srednja Gala jabuka sadrži 22 g ugljikohidrata (Bašić, 2017).

2.3.4 Fitokemikalije i flavonoidi

Flavonoidi su obrambene fitokemikalije koje se nalaze u jabukama. Zabilježeno je da flavonoidi djeluju protuvirusno, protualergijski, protuupalno, protu-tumorski i antioksidativno. Istraživanja su pokazala da fitokemikalije mogu zaštititi od procesa starenja (https://hr.kenkosokushin.com/what-is-the-nutritional-value-of-a-gala-apple).

Tablica 2.1. Vitaminsko-mineralni sastav Gala jabuke u 100 g
(https://www.tablicakalorija.com/voce/jabuke-gala.html)

NUTRIJENTI	MJERNA JEDINICA	KOLIČINA
Energetska vrijednost	kcal	57
Ukupno proteina	g	0,25
Ukupno ugljikohidrata	g	13,68
Ukupno masti	g	0,12
Dijetalna vlakna	g	2,3
Ukupno šeććera	g	10,37
Voda	g	85,76
Trans-masti	g	0,000
Vitamin B1 (tiamin)	mg	0,017
Vitamin B2 (riboflavin)	mg	0,029
Vitamin B3 (niacin)	mg	0,075
Vitamin B5 (pantotenska kiselina)	mg	0,055
Vitamin B6 (pridoksin)	mg	0,049
Vitamin B9 (folati)	mcg	3
Vitamin A	IU	28
Vitamin E	mg	0,18
Vitamin K	mcg	1,3
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
Bakar (Cu)	mg	0,021
Mangam (Mn)	mg	0,037
Selen (Se)	mcg	0,0

2.4 Agroekološki uvjeti i uzgoj

Jabuke sorte Gala podnose temperature i do -25 °C, ali i temperature do +37 °C. Gala pripada grupi koja zahtjeva 500 do 1000 sati ispod 7 °C (inaktivne temperature).Vegetativni organi vrlo su osjetljivi prema nižim temperaturama na početku i na kraju vegetacije (Miljković, 1991). Vrlo je osjetljiva na bakterijsku palež- *Erwinia amylovora* (http://ucanr.org). Gala jabuke vole puno sunca i traže izravno izlaganje suncu više od 6 sati dnevno. Za uzgoj plodova potrebno je odabrati sunčano mjesto sa dobro dreniranim tlom koje je zaštićeno od jakih vjetrova. Ako se nalazi na mjestu gdje ima previše sjene, stablo će proizvoditi manje kvalitetne plodove. Potrebno je osigurati stablima što više prostora za korijenje, ali i za krošnju što može pomoći u prevenciji bolesti (http://www.ucanr.homeorchard.edu/). Za uzgoj plodova potrebne su niske količine vode, ako su posađene u prikladnom tlu, ali i položaju, također ovisi o temperaturi i veličini stabla. Potrebno je održavati korjenovu koru vlažnom, ali ne i mokrom. U umjerenim ljetima potrebno je 5 do 10 litara vode tjedno. Kako stablo raste i postaje zrelije potrebno je rjeđe i dublje navodnjavanje. Korov i malč oko stabla smanjit će potrebnu količinu vode, ali malč se obavezno treba držati na udaljenosti od 4-6 cm od debla. Pjeskovito ilovasta i pjeskovito glinasta tla su najbolja za uzgoj. Upravo zbog toga hranjive tvari se brzo ispiru iz tla i potrebno je obaviti gnojidbu. Mlada stabla potrebno je gnojiti dušičnim gnojivom tri puta, u ožujku, svibnju i srpnju. Ako je tlo vrlo suho, moramo navodnjavati dan prije gnojidbe, kao i neposredno nakon gnojidbe . Povoljan pH tla je 5,5 – 7 (http://www.ucanr.homeorchard.edu/). Iako Gala nema velike zahtjeve za vodom, korisno je na vrijeme prepoznati probleme s viškom ili manjkom vode. Slaba odvodnja tla može rezultirati sporijim rastom stabla i odumiranjem korijena, dok suša može uzrokovati sporiji rast izboja i smanjiti veličinu i kvalitetu plodova. Prilikom suše može se javiti i problem s nedostatkom kalcija, te se mogu javiti mrlje na plodovima (http://homeguides.sfgate.com). Kalcij se apsorbira korijenom samo u vlažnim uvjetima, a ako je tlo suho ovaj problem može se smanjiti zalijevanjem tla vodom. Jedan od znakova viška vode u tlu može biti i pucanje plodova. Prilikom uzgoja jabuka najčešće se koristi kao uzgojni oblik vretenasti grm ili kombinacija vretenastog grma i vitkog vretenastog grma. Sadnja se može obavljati u proljeće ili u jesen, ali se više preporučuje jesenska sadnja. U prvim godinama trebamo posvetiti veliku pozornost prihrani biljaka (Miljković, 1991).

2.5 Razmnožavanje jabuke

Cvjetne vrste mogu se razmnožavati na dva načina: vegetativno i generativno, a prije svega bitno je poznavati načine razmnožavanja. Razmnožavanje je biološka potreba svakog živog organizma (Parađiković, 2014). Ovisno o načinu razmnožavanja odlučuje se o tehnologiji uzgoja biljaka. Generativno razmnožavanje predstavlja razvoj biljaka iz sjemena dok je vegetativno razmnožavanje, razmnožavanje reznicama i mikropropagacijom u *in vitro* uvjetima.

2.5.1 Vegetativno razmnožavanje

Za svaku je sortu vrlo važno očuvanje svojstava koja su za nju karakteristična. To je moguće postići vegetativnim razmnožavanjem. Ovaj način razmnožavanja jako je važan i za one kultivirane vrste koje u određenim uvjetima uzgoja ne stvaraju sjeme ili je sjeme izrazito loše kvalitete (Dubravec, 1998). Vegetativnim razmnožavanjem dobivaju se nove biljke zakorjenjivanjem njezinih pojedinih dijelova, uz pomoć reznica stabljike, lista, korijena, lukovicama, kalemljenjem i mikropropagacijom. Reznice stabljike mogu biti: zelene, zrele i poluzrele (Parađiković, 2014). Cijepljenje ili kalemljenje je oblik vegetativnog razmnožavanja, odnosno proces kojim se dio biljke zvan plemka prenosi na dio biljke tj. podlogu s ciljem da međusobno srastu u novi organizam (Kantoci, 1996). Postoji niz različitih načina cijepljenja plemke na podlogu kao što je okuliranje, cijepljenje pod koru, cijepljenje u raskol, cijepljenje na isječak i mnogi drugi, a svakome je cilj stvaranje boljeg roda plemke (Parađiković, 2014). Jedan od načina vegetativnog razmnožavanja je mikrorazmnožavanje kojim se dobivaju genetski identične biljke. Na početku se dobiju vrlo sitni izdanci, tj. biljke koje se presađuju u tlo. Izdanci se mogu razvijati iz već postojećih pupova ili iz novozametnutih pupova tj. adventivnih izdanaka.

2.5.2 Generativno razmnožavanje

Generativno razmnožavanje predstavlja rekombinaciju gena zbog čega ne možemo znati hoće li se poželjne osobine matične biljke kod potomaka zadržati. Za uspjeh generativnog razmnožavanja vrlo su važna svojstva sjemena: klijavost, energija klijanja, apsolutna težina, čistoća, izgled i porijeklo sjemena (sortno, hibridno, nesortno) (Parađiković, 2014). Generativno razmnožavanje ima prije svega nedostatak u tome što često ne znamo kakva će svojstava imati biljka koja je izrasla iz sjemena (Dubravec i sur., 1998).

3. MIKROPROPAGACIJA JABUKE

Mikrorazmnožavanje je postupak multipliciranja biljnog materijala u posebno specijaliziranim laboratorijima u *in vitro* uvjetima. Ovaj način razmnožavanja biljaka naziva se tako jer su biljni organi ili cijele biljke, u odnosu na generativnu proizvodnju, u minijaturnim dimenzijama. Sam naziv kultura *in vitro* označava uzgoj kultura u staklenim ili prozirnim posudama. Postupak osigurava vrlo brz proces dobivanja velikog broja biljaka, koje su istovjetne po razvoju, rastu i genetičkom potencijalu vrste. To je proces kloniranja, jer sve proizvedene biljke predstavljaju matične kopije razmnoženog majčinskog uzorka (Pintarić, 2008). Osnovna ideja 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 (Parađiković, 2014). To znači da stanica koja je iskusila diferencijaciju u višestaničnom organizmu još uvijek sadrži njegovu genetičku informacije iz prethodne forme. To je povezano s konceptom totipotentnosti koji nalaže da svaka stanica u biljnom tkivu nosi isti genetički materijal, a može se diferencirati u organizam identičan matičnoj stanici ako su ispunjeni zahtjevi i nalaze se pod prikladnim okolišnim uvjetima (Nur Azimi Bin Azizan, 2017). Prvi uspjeh u korištenju tehnike kulture tkiva zabilježio je White 1943. uzgojem vrha korijena rajčice u mediju te je promovirao rast korijena 28 godina, te je proizveo 1600 supkultura (Nur Azimi Bin Azizan, 2017). U posljednje vrijeme kultura vrha izdanaka koristi se u komercijalnoj proizvodnji više od 300 ukrasnih vrsta. Tehnike kulture tkiva pogodne su za masovnu proizvodnju zbog lakog upravljanja i potrebnog malog prostora. Mikropropagacija jabuke (Slika 3.1.) ima jako važnu ulogu u proizvodnji zdravih biljaka bez bolesti, te stvaranju podloga s poželjnim svojstvima.

Uspješnost mikropropagacije jabuke korištenjem meristema (kultura apikalnih pupova ili nodalnih segmenata) pod utjecajem su većeg broja unutarnjih i vanjskih čimbenika, uključujući *ex vitro* (npr. genotip i fiziološko stanje) i *in vitro* uvjete (npr. sastojci iz medija i svjetlosti. Jabuka se konvencionalno razmnožava vegetativnim metodama, poput kalemljenja koje ne osiguravaju zdrave biljke bez bolesti, što obično rezultira niskim stopama umnažanja. Glavna prednost mikropropagacije jabuke je to što jabuka ima jako velik kapacitet za umnažanje ciljanog biljnog materijala u usporedbi s 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).

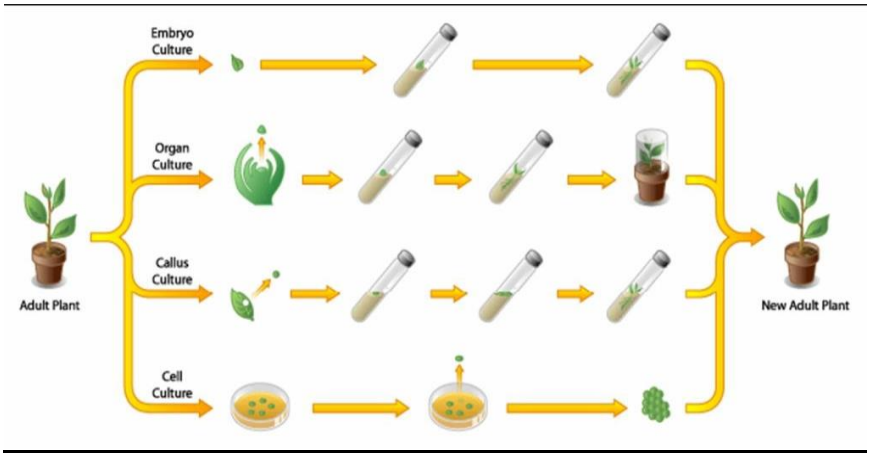
Nadalje, mikropropagacija omogućuje brzo širenje novih sorti ili uzgojnih linija za uzgajivače jabuka. To je bitan korak u uspjehu regeneracije transgenih linija i određuje učinkovitost protokola transformacije. Povijest kulture tkiva jabuka seže u kasne 1960-te i rane 1970-e kada su izdanci jabuke uzgajani *in vitro* i tada je prvi put zabilježen aksenični rast. Od tada su mnogi genotipovi jabuke uspješno kultivirani u *in vitro* uvjetima (Dobránszki i sur., 2010).



Slika 3.1. *In vitro* uzgoj jabuke (*Malus domestica)*
(Foto: Matea Jurić)

3.1 Tehnike i faze mikropropagacije

Općenito se *in vitro* kultura tkiva ili mikropropagacija (Slika 3.2.) definira kao kultura različitih somatskih stanica, tkiva ili organa biljaka koje se nalaze u kontroliranim uvjetima *in vitro* s ciljem stvaranja velikog broja biljka ili potomaka koji su genetski identični matičnoj biljci, a u relativno kratko vrijeme u usporedbi s konvencionalnim razmnožavanjem (Dobránszki i sur., 2010). Iz ovoga slijedi da je kloniranje *in vitro* nastalo na temelju činjenice da su različiti dijelovi biljaka kao što su pupovi, meristemi, tkiva i stanice sposobni za regeneraciju cijele biljke u odgovarajućim *in vitro* uvjetima.



Slika 3.2. Postupci u *in vitro* mikrorazmnožavanju

(izvor: http://agritech.tnau.ac.in/bio-tech/biotech_tc_notes.html)

Glavne faze mikropropagacije su:

- uspostavljanje kulture *in vitro* pri čemu se provodi sterilizacija biljnog materijala
- umnožavanje tj. multiplikacija izdanaka
- zakorjenjivanje
- aklimatizacija zbog prilagođavanja biljaka na jači intenzitet fotosinteze i proizvodnje fotosintetskih produkata te na smanjenu vlagu (Dobránszki i sur. 2014).

Glavne prednosti mikropropagacije jabuke su:

- predstavlja ogroman kapacitet za umnožavanje ciljanog biljnog materijala u usporedbi s konvencionalnim metodama kloniranja
- ima mogućnost stvaranja potomstva tijekom cijele godine
- koristi se za proizvodnja biljnog materijala bez bolesti
- ima mogućnost umnažanja genotipova koji se koriste za proizvodnju sjemena ili za proizvodnju sjemena koje je sterilno (Dobránszki i sur., 2010).
- U kulturi *in vitro* razmnožavaju se samo zdrave biljke, bilo da je to ujedinjeno sa strogom selekcijom početnog materijala ili pak da biljke ozdravljaju primjenom kulture *in vitro* (Parađiković, 2014)

Nedostaci mikrorazmnožavanja- Genetička stabilnost u nekim je sustavima razmnožavanja *in vitro* vrlo niska.

- Biljke iz kulture mogu, nakon prijenosa u uvjete *in vivo*, pokazati neke loše značajke kao npr. grmoliki rast ili potpuni povratak na juvenilne karakteristike.
- Prijenos biljaka iz uvjeta *in vitro* u uvjete *in vivo* kod nekih je vrsta jako zahtjevan i težak.
- Kod drvenastih vrsta vrlo je teško potaknuti zakorjenjivanje reznica *in vitro*.
- Mikroklonirani genotip biljaka, koji će se na kraju uzgajati u polju na otvorenom, može biti osjetljiv na bolest i uništen od patogenog organizma koji ga je napao. Kod tropskog drveća kao što su uljne palme (ali i druge drvenaste kulture) nasadi su zasađeni s više klonova, kako bi se izbjegao ovaj problem.
- Regenerativna sposobnost se može izgubiti nakon određenog broja supkultura kalusnog tkiva ili stanica.
- Neke od glavnih značajki kloniranja *in vitro* je opsežan rad koji uvjetuje relativno visoku cijenu nastalih biljaka *in vitro*.
- Prilikom uzgoja *in vitro* razina etilena i ugljičnog dioksida može se povećati na neprihvatljivu razinu, rezultirajući time da dobijemo biljke lošije kvalitete.
- Prilikom prijenosa biljaka iz epruvete u tlo, dolazi do gubitka velikog broja biljaka tijekom aklimatizacije (Parađiković, 2014)

Mogu se razlikovati dvije glavne metode razmnožavanja *in vitro*:

(1) Razmnožavanje iz aksilarnih ili završnih pupova pri čemu nove biljke nastaju iz već postojećih meristema. U ovu tehniku uključeni su:

- kultura meristema
- kultura izdanaka ili vrha izdanaka
- kultura nodalnih segmenata

(2) Razmnožavanje stvaranjem adventivnih izdanaka ili adventivnih somatskih embrija, primjenom eksplantata koji potječu iz somatskih tkiva. To može dovesti do adventivnih izdanaka ili stvaranja embrija izravno iz tkiva izrezanih eksplantata bez prethodnog formiranja kalusa (izravna organogeneza ili izravna embriogeneza) ili kada se mladice ili embriji regeneriraju na prethodno stvorenom kalusu (neizravna organogeneza ili neizravna embriogeneza) (Dobránszki i sur., 2010).

Kod velikog broja biljnih vrsta izravna organogeneza je rijetko primijećena ili je nepoznata. Nasljeđena genetska varijabilnost koja je inducirana tijekom *in vitro* uvjeta definira se kao somaklonska varijabilnost koja može biti veliki problem u komercijalnoj mikropropagaciji jer može imati negativan utjecaj na ujednačenost potomaka (Dobránszki i sur., 2010). Kada se razmnožavanje događa tvorbom adventivnih izdanaka ili somatskih embrija, a osobito kada se regeneracija događa na prethodno formiranom kalusu (neizravno), učestalost somaklonalnih varijacija može se povećati. Također na varijabilnost može utjecati i podrijetlo kalusa (Dobránszki i sur., 2010).

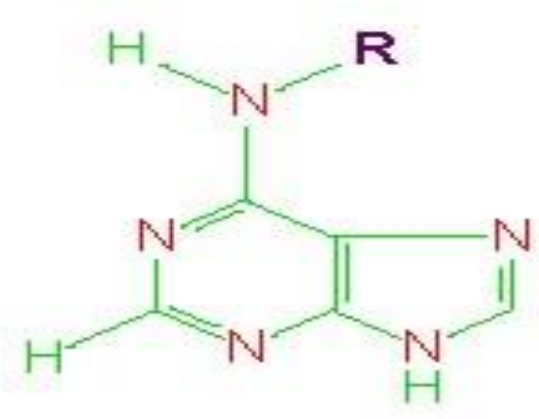
Genetska stabilnost potomaka tijekom mikrorazmnožavanja uz pomoć kulture meristema zabilježena je i kod drugih biljnih vrsta, poput jagode, međutim somaklonske varijacije mogu biti koristan i važan alat za usjeve zbog povećanja genetske varijabilnosti što doprinosi odabiru osobina, kao što je otpornost na bolesti, herbicide ili tolerantnosti na različite abiotske stresove (Dobránszki i sur., 2010 Mikropropagacija je postala rutinski postupak, ali visoki troškovi koji su uključeni spriječili su laboratorije s ograničenim resursima da iskoriste tehnologiju kulture tkiva. Stoga se kontinuirano ulažu napori da se poveća učinkovitost sustava poboljšanjem medija i tehnika kulture tkiva (Reddy i sur., 2014).

3.2 Regulatori rasta biljka

Regulatori rasta kod biljaka predstavljaju organsku tvar koju biljka zahtijeva u jako maloj količini za razvoj (Nur Azimi Bin Azizan, 2017). Regulatori rasta ili biljni hormoni mogu biti prirodni ili sintetički. Biljni hormoni ili fitohormoni su organske supstance koje nisu hranjive, ali djeluju u minimalnim količinama na rast i razvoj biljaka, te usklađujući te procese s promjenama u vanjskoj sredini. Znamo da su biljke sesilni organizmi i da je za njih jako važno da njihov rast i razvoj bude usklađen sa vanjskim uvjetima sredine. Biljni hormoni se sintetiziraju u vegetativnim dijelovima biljke tj. najčešće u korijenu i u listovima, odakle se dalje prenose do odgovarajućih mjesta u kojima ostvaruju fiziološki efekt. Sve biljne hormone možemo svrstati u pet osnovnih grupa, a to su: auksini, giberelini, citokinini, apsicizinska kiselina i etilen (https://biologija-gimnazija.weebly.com/biljni-hormoni.html). Hormoni mogu djelovati na aktivnost pojedinih gena i postojećih enzima i mijenjati svojstva plazmatskih membrana. Bilo koje djelovanje ovih hormona može uzrokovati promjene u metabolizmu i razvoju stanice. Bitno je napomenuti da reakcija na pojedini biljni hormon ne ovisi toliko o njegovoj apsolutnoj koncentraciji koliko o odnosu koncentracija svih prisutnih hormona. Razina hormona koji se nalaze u biljci ovisi o rodovima, vrstama i kultivarima (Nur Azimi Bin Azizan, 2017). Ravnoteža hormona pokazala je sposobnost stimuliranja stvaranja izdanka.

3.2.1 Citokinini

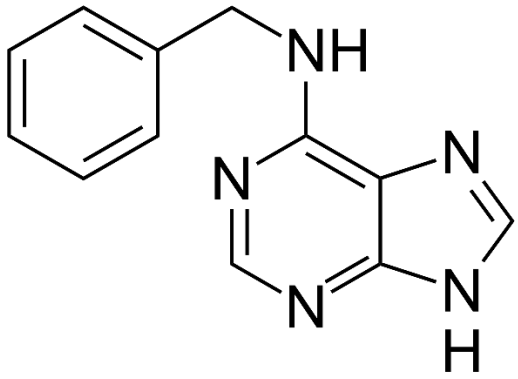
Citokinini (cito- + grč. *κινεῖν:* kretati se) su hormoni rasta prisutni kod biljaka koji se obično dobivaju iz organske dušične baze adenina. Citokinini (Slika 3.3.) su biljnih hormoni, koji imaju glavnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i razvoja biljke. Stvaraju se u korijenu odakle ksilemom putuju do lišća i plodova gdje su potrebni za normalan rast, diferencijaciju stanica, a zajedno s auksinima pospješuju diobu stanica (Nur Azimi Bin Azizan, 2017). Citokinine su otkrili Skoog i Miller tijekom 1950-ih u Americi kao čimbenike koji podupiru diobu stanica (citokineza). Skoog i njegovi suradnici koristili su aseptičke kulture tkiva zrele srčike duhana, potičući diobu parenhimskih stanica dodavanjem različitih tvari u hranjivu podlogu. Testirali su niz tvari, uključujući i stari uzorak DNA iz sperme haringe, koji se pokazao izuzetno djelotvornim u poticanju rasta. Iz autoklaviranog uzorka DNA sperme haringe izoliran je 6-furfurilaminopurin (C10H9N5O) nazvan kinetin. Molekula kinetina je modificirani oblik adenina, sastojka DNA. Iako se kinetin u takvom obliku ne pojavljuje u prirodi nego je nusprodukt razgradnje DNA koji je dobiven induciranim zagrijavanjem, ovo je otkriće upućivalo na zaključak da prirodno postoje molekule koje su strukturno slične kinetinu i mogu regulirati aktivnost staničnih dioba u biljkama (Nur Azimi Bin Azizan, 2017). Svi ovi podaci ubrzo su potvrđeni otkrićem prirodnih citokinina kao što je zeatin, izopentenil-adenin, zeatin-ribozid i dr.
Prvi prirodni citokinin identificiran je kod nezrelih zrna kukuruza i imenovan je zeatin (6- (4-hidroksi-3-metilbut-2-enilamino) purin. Prirodni citokinini, ali i većina njihovih sintetičkih derivata, pokazuju negativne učinke na rast korijena i njihov razvoj. Promjene koje se događaju u morfologiji, prvenstveno su povezane s inhibicijom stanične diobe u meristematskoj zoni, koje se očituju kao zadebljanje i skraćivanje primarnog korijena, te oslabljeno bočno grananje korijena (Dobránszki i sur., 2010). Citokinini su prisutni u svim biljnim tkivima, a to su: vrhovi korijena, vrhovi izdanka i nezrelo sjeme. Njihova endogena koncentracija je u niskom rasponu mg/l. Poznato je da postoji nekoliko vrsta kod kojih u početnoj kulturi nije potreban egzogeni hormon, ali kod većine biljaka treba jako mala količina citokinina za potporu rasta meristema (Nur Azimi Bin Azizan, 2017). Svi poznati prirodni citokinini su po kemijskom sastavu N6-supstituirani derivati adenina, koji imaju bočni lanac od 5 C-atoma vezan na šestom C-atomu adenina. Danas postoje brojni prirodni citokinini, a proizvode se i sintetski spojevi koji pokazuju citokininsku aktivnost. Gotovo svi sintetski spojevi koji pokazuju citokininsku aktivnost su N6-supstituirani derivati adenina. Sintetski citokinin je npr. benzil-adenin (BA) koji u bočnom lancu ima prstenasti sustav. Iznimka su neki derivati koji imaju slabu citokininsku aktivnost. Nije još poznato zašto su oni aktivni, ali se smatra da stimuliraju biosintezu prirodnih citokinina. Neki od tih sintetskih citokinina pokazuju aktivnost kao prirodni, ako ne i jaču. Benzil-adenin je npr. u nekim biotestovima aktivniji i od najjačeg prirodnog citokinina, zeatina. Pokazalo se da imaju vrlo bitnu ulogu u diferencijaciji stanica, rastu i diobi stanica.



Slika 3.3. Struktura citokinina
(izvor: https://www.znanje.org/i/i25/05iv02/05iv0211fll/index4.htm)

Citokinin koji se najčešće koristi u kulturi biljnog tkiva je BAP (6-benzilamino purin). To je zato što je BAP stabilniji u odnosu na ostale citokinine, teže oksidira uz pomoć svjetlosti, jeftiniji je i lakše ga je dobiti (Nur Azimi Bin Azizan, 2017). BAP (Slika 3.4.) je također učinkovitiji jer ima veću sposobnost promicanja drugih hormonalnih sinteza (Muhammad Nur Azimi Bin Azizan, 2017). Upotreba BAP-a za uzgoj biljka *in vitro* obično je u rasponu od 1,0 do 3,0 mg/l. Ako je koncentracija previsoka, može uzrokovati sporiji razvoj pupa, što dovodi do zakržljalog rasta biljke, ali učinak može varirati kod različitih vrsta (Muhammad Nur Azimi Bin Azizan, 2017). Također mogu imati i druge fiziološke funkcije, kao što je kretanje organskih tvari iz drugih dijelova biljke prema mladim listovima i plodovima, sprečavaju starenja lista itd. BAP ima izrazit učinak na poticanje rasta pomoćnih (bočnih) i adventivnih pupova i folijarni razvoj kultura vrhova izdanaka. Stopa razmnožavanja adventivnih pupova pod utjecajem BAP-a jedan je od odlučujućih čimbenika o kojima ovisi učinkovitost sustava mikropropagacije (Reddy i sur., 2014.) U mikropropagaciji, N6-furfuriladenin (kinetin), N6-izopenteniladenin (iP), trans-zeatin (tZ) i N6-benzilaminopurin (BAP) su najčešće korišteni citokinini za ponovnu diferencijaciju kalusa u adventivne pupove. Citokinini s izoprenoidnim bočnim lancem (iP, tZ) imaju jedan glavni nedostatak u odnosu na aromatične citokinine, a to je da su dosta osjetljiviji i dolazi do brže oksidativne razgradnje. Dakle, i kinetin i BAP su stabilniji *in vivo*, i pokazuju antisenescenciju i antistresna svojstva, koja mogu biti povezana s njihovom sposobnošću sprječavanja stvaranja reaktivnih vrsta kisika. Iako se BAP danas trenutno koristi kao najčešći i najpristupačniji aromatični citokinin u razmnožavanju kulture tkiva, njegovo korištenje može imati nekoliko nedostataka poput nekroze vrha izdanaka, inhibicije ukorjenjivanja i problematične aklimatizacije biljke u stakleniku (Plíhal i sur., 2013). Citokinini imaju presudan utjecaj na regulaciju rasta kod biljaka kao i na stabilizaciju fotosinteze tijekom izloženosti biljke bilo kojem stresu. Zabilježena je primjena i modulacija razine citokinina koja ima pozitivan učinak na toleranciju na sušu. Međutim, široko upotrijebljeni aromatični citokinin N6-benziladenin se brzo N-glukozira u biljkama i nakupljeni N7- i N9-glukozidi mogu dovesti do inhibicije rasta. Suprotno tome, hidroksiliran je derivat, meta-topolin koji se deaktivira

glukozilacijom na bočni lanac (Plíhal i sur., 2013). Rezultirajući O-glukozid služi kao oblik za pohranu citokinina koji se mogu postupno hidrolizirati, oslobađajući aktivni spoj. Upravo zbog toga aromatični citokinini se koriste za razne eksperimente, a najčešće se koristi meta-topolin (Plíhal i sur., 2013). Ekspresija citokinina dovela je do usporenog rasta i povišenog sadržaja zaštitnih spojeva, što je doprinijelo povećanju otpornosti na sušu. S druge strane, povećanje sadržaja citokinina također može pomoći biljkama da toleriraju sušu, što je pokazalo nekoliko studija (Plíhal i sur., 2013). Povišenje citokinina uglavnom je postignuto prekomjernom ekspresijom citokinin biosintetskog gena izopentenil transferaze, koji je pokretač promotora senescencije ili stresa (Plíhal i sur., 2013). Mnogi sustavi mikropropagacije najviše koriste 6-benzilaminopurin (BAP) citokinin jer je učinkovitiji i ekonomičniji (de Souza i sur., 2019). Međutim, nekoliko morfofizioloških poremećaja poput hiperhidričnosti pripisuju se upotrebi ovog regulatora rasta. Hiperhidričnost je morfofiziološki poremećaj u kojem kod biljke dolazi do abnormalnog nakupljanje vode unutar stanica ili tkiva, što rezultira prozirnim izgledom same biljke (de Souza i sur., 2019). Hiperhidričnost je vrlo relevantan problem u mikropropagaciji, jer može dovesti do poremećaja prilikom faze aklimatizacije. Prilikom aklimatizacije bitno je imati sadnice s visokim udjelom rasta i jednolikosti jer se koriste za sadnju u polja. Dakle, morfofiziološka kvaliteta sadnica je vrlo važna za uspjeh prilikom aklimatizacije biljaka u polje (de Souza i sur., 2019). Otkriće nove skupine aromatičnih citokinina koji su proučavani kao alternativna zamjena za BAP, prvenstveno se koriste kako bi se smanjili fiziološki poremećaji uzrokovani njihovim pretjeranim ili dužim korištenjem (de Souza i sur., 2019).



Slika 3.4. Struktura 6-benzilaminopurina

(izvor: https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Benzylaminopurine.svg)

Naziv meta-topolin izveden je iz češke riječi "topol" što znači topola. Predstavlja aromatske citokinine inzolirane iz lišća topole. Baš kao i zeatin i BAP, meta-topolin može se podvrgnuti ribozilaciji na položaju 9 bez nekog značajnog utjecaja na aktivnost. Meta-topolin (mT) je analogni Benziladenin koji predstavlja visoko aktivne citokinine. Metabolizam mT ne razlikuje se mnogo od metabolizma ostalih citokinina, jedna od značajnih razlika u odnosu na BAP je ta što nije zabilježena velika inhibicija rasta korijena kao što je kod BAP-a u većim količinama (Werbrouck, 2010). Najveća razlika između mT-a i BAP-a jest u kemijskoj strukturi jer je mT hidroksilirani derivat BAP-a koji se deaktivira glukozilacijom bočnog lanca i služi kao skladišni oblik citokinina koji se može postupno hidrolizirati, te time otpuštati aktivnu supstancu i produžiti vrijeme učinka citokinina (Prerostova i sur., 2018).

Citokinini i auksini su neophodni hormonski sastojci koji se koriste u hranjivim podlogama za stvaranje izoliranih biljnih stanica i tkiva u kulturi *in vitro*. Ova metoda nam pruža mogućnost da se ispituju rast i diferencijacija stanica i omogućuje nam istraživanje o hormonskoj regulaciji ovih procesa (https://biologija-gimnazija.weebly.com/biljni-hormoni.html). Svojstva citokinina i auksina koja utječu na organogenezu mogu se pokazati sljedećim primjerom. Ako se izolira dio tkiva stabljike duhana i uzgaja na hranjivoj podlozi koja sadrži potrebne hranjive sastojke, a od hormona auksin (indol-3-octena kiselinu) i citokinin (kinetin) u istim koncentracijama, doći će do diobe stanica i njihovog uvećavanja. Na ovakvom mediju stvara se kalus koji se sastoji od mase nediferenciranih stanica. Ako se kalusno tkivo prenese na hranjivu podlogu koja sadrži veću koncentraciju auksina nego citokinina, pojavit će se korijenčići. Ako je koncentracija citokinina veća od koncentracije auksina, pojavit će se pupovi (https://biologija-gimnazija.weebly.com/biljni-hormoni.html). U kulturi *in vitro* iz ovakvih pupova može se izolacijom i zakorjenjivanjem pomoću indol-3-maslačne kiseline regenerirati cijela biljka. Grananje izdanaka u velikoj mjeri ovisi o pokretanju i aktivnosti aksilarnih meristema, koji su hormonalno kontrolirani uglavnom citokininima; no oni djeluju u interakciji s auksinima iako je poznato da je auksinski učinak neizravan. Auksini i citokinini se najčešće koriste kao regulatori rasta u kulturi tkiva. Omjer auksina i citokinina određuju vrstu kulture koja je uspostavljena ili tip regeneracije (Nur Azimi Bin Azizan, 2017). Omjer se obično razlikuje prema rodovima i vrstama u smislu biljne osjetljivosti na hormone. Taj omjer predstavlja definiciju u stvaranju meristema. Citokinina ima u izobilju na mjestima s velikom aktivnošću proliferacije stanica, poput klijanja sjemena, razvoja plodova i lišća te vrhova korijena. U suradnji s auksinima sudjeluju u diobi stanica i kontroliraju apikalnu dominaciju. Dakle u ovom je slučaju njegov odnos antagonistički, auksin inhibira rast bočnih pupova, dok citokinin potiče taj rast. Modulacija sadržaja jednog hormona obično rezultira promjenama ostalih razina hormona, kako bi se zadržao poželjan omjer hormona. Postoji prisan odnos između citokinina i auksina. I citokini i auksini su neophodni za stanični ciklus, a time i za diobu stanica. Bitni su za koordinaciju rasta nadzemnih i podzemnih dijelova biljke. Njihov omjer kontrolira morfologiju rastućih tkiva (Plíhal i sur., 2013).

Citokinini se najčešće koriste u poljoprivrednim tehnologijama, te prilikom regeneracije biljaka u *in vitro* uvjetima (de Souza i sur., 2019). Auksini, giberilini i citokinini pokazuju uglavnom stimulativno djelovanje, dok apscizinska kiselina i etilen djeluju inhibitorno.

3.2.2 Citokinini u podlozi za mikropropagaciju jabuke

Citokinini dodani u medij za mikropropagaciju vrlo su važni tijekom kulture tkiva jabuke jer potiču diobu i organogenezu i utječu na druge fiziološke i razvojne procese (Teixeira da Silva i sur., 2019). Uspjeh kulture na koju utječe ovisi o vrsti i koncentraciji primijenjenih citokinina, jer se njihovo usvajanje, transport i metabolizam razlikuju između sorti i mogu komunicirati s endogenim citokininima eksplantata. Veliki broj autora navodi da je BAP jedini citokinin koji efektivno potiče umnažanje izdanaka *in vitro* između genotipova različitih vrsta (Valero-Aracama i sur., 2009). Međutim, uočeni su značajani negativni učinci prijenosa BAP-a na genotip prilikom aklimatizacije, pa su učinci multiplikacijskih medija nadopunjeni meta-Topolinom (mT) ili bez regulatora rasta biljaka, nakon čega su uspoređivani tijekom *in vitro* razmnožavanja, ukorjenjivanja i *ex vitro* aklimatizacije (Valero-Aracama i sur., 2009). Zbog neželjenih posljedica sintetskih citokinina sve se više istraživanja počinje raditi s citokininom meta-topolinom koji je hidrolizirani oblik BAP-a.

U novije vrijeme pokazalo se da je mT dosta bolji citokinin u odnosu na BAP za razmnožavanje izdanaka, pojačano ukorjenjivanje, smanjenu hiperhidričnost i pojačanu aklimatizaciju *Aloe polyphylla ex vitro* (Bairu i sur. 2007). 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. Stopa multiplikacije izdanaka *Aloe polyphylla* bila je neznatno veća na mediju s dodatkom 5 µM mT u odnosu na ekvivalentnu količinu BAP-a (Bairu i sur. 2007). S obzirom na ova izvješća, istražena je mogućnost da se mT može prihvatiti kao zamjena za BAP za osiguravanje pouzdane multiplikacije i *ex vitro* aklimatizacije biljaka (Valero-Aracama i sur., 2009). Multiplikacija izdanaka jabuke temelji se na hranidbenom mediju uz dodatak citokinina kao glavnih regulatora rasta (Prerostova i sur., 2018). Osim citokinina medij također može sadržavati u nižoj koncentraciji i auksine i u nekoliko slučajeva gibereline (Dobránszki i sur., 2010).

3.2.3 Utjecaj citokinina na stvaranje adventivnog korijenja

Citokinin inhibira stvaranje adventivnog korijenja (AK) na reznicama (Mao i sur., 2018). U osnovi malo je poznato o ovome mehanizmu inhibicijskog učinka. Provedeno je ispitivanje na jabuci gdje je primijenjeno 2 mg egzogenog 6-benzilaminopurina (BAP) na 3 i 7 dana starim podlogama jabuke „M.26“ prenoseći ih iz medija za ukorjenjivanje koji je sadržavao indol-3-maslačnu kiselinu na medij koji sadrži BAP. Anatomska i morfološka promatranja otkrila su da egzogena primjena BAP inhibira stvaranje primordija u 3-dnevnoj BAP grupi, ali ne i u 7-dnevnoj BAP skupini. U trodnevnoj BAP skupini visoka razina citokinina inhibirala je sintezu i transport auksina, što je imalo za posljedicu nisku endogenu razina auksina koji nije dozvoljavao ekspresiju gena signalnog puta auksina, kao i drugih gena povezanih s razvojem i staničnim ciklusom; sve je to imalo inhibitorni utjecaj na stvaranje adventivnog korijenja (Mao i sur.,

2018). Naprotiv, niska razina citokinina kod 7 dana starih podloga prenešenih u medij s BAP-om, smanjila je inhibicijski utjecaj na razinu auksina, što je dovelo do reguliranja ekspresije gena za koje je poznato da potiču stvaranje adventivnog korijenja. Ovi podaci pokazali su da je 3-7 dana vremensko razdoblje u kojem se AK formira u reznicama 'M.26' i da je inhibicija AK od strane citokinina posljedica suzbijanja razvoja primordija AK tijekom 3–7 dana nakon uzgoja u mediju za ukorjenjivanje. Mehanizmi odgovorni za stvaranje AK proučavani su u biljkama poput riže, *Arabidopsis* i topole, međutim molekularni mehanizmi u osnovi adventivnog ukorjenjivanja u M.26 trebaju se još razjasniti. Prema definiciji, adventivno korijenje formira se u nekorijenskim organima (Mao i sur., 2018). Stvaranje adventivnog korijenja iz reznica stabljike obično se dijeli u nekoliko faza na temelju fizioloških i metaboličkih biljega i može se kategorizirati kao postupak u četiri faze:

Faza 1: Aktivacija adventivnog korijenja
Faza 2: Indukcija adventivnog korijenja
Faza 3: Inicijacija adventivnog korijenja
Faza 4: Pojava adventivnog korijenja

Međutim, malo je izravnih dokaza da se iz iste faze razvoja javlja adventivno korijenje kod jabuke. Faza inicijacije, kada se primordiji adventivnog korijenja formiraju iz nediferenciranih stanica kalusa koje su bile podvrgnute reprogramiranju, služi kao temelj stvaranja adventivnog korijenja. Biljni hormoni također imaju važnu ulogu u regulaciji stvaranja korijenja, jer moduliraju fiziologiju stanica kao odgovor na promjene u okolišu i pružaju signalne mreže unutar biljke koja određuje stanicu. Postoje dokazi koji ukazuju da citokinini inhibiraju stvaranje adventivnog korijenja (Mao i sur., 2018). Temeljni molekularni mehanizmi inhibicije stvaranja adventivnog korijenja izazvani citokininima, još uvijek nisu dovoljno definirani. Egzogena primjena citokinina inhibira adventivno ukorjenjivanje, a egzogena primjena auksina široko se koristi za stvaranje korijenja u mnogih biljnih vrsta (Mao i sur., 2018). Dakle citokinini i auksini pokazuju antagonističko djelovanje na regulacija razvoja korijena biljaka te imaju važnu uloga u održavanju veličine korijenskog meristema. Kontrola i funkcija homeostaze biljnih hormona i s tim povezane signalizacijske mreže u stvaranju adventivnog korijenja u podlogama jabuke, nije potpuno razjašnjena. Trenutno je mehanizam inhibitornog učinka citokinina na stvaranje adventivnog korijenja slabo opisana. Stoga, studije namijenjene rasvjetljavanju mehanizma kojim citokinin inhibira stvaranje adventivnog korijenja u jabuci vrlo su važna.

Utvrđeno je da citokinini inhibiraju rane faze pokretanja i formiranja primordija AK (Mao i sur., 2018). Daljnja analiza provedena je kako bi se procijenila razina endogenih hormona, te ekspresija određenog broja odabranih gena koji su uključeni u aktivnost citokinina, auksina, stanični ciklus i razvoj AK. Iz rezultata se može vidjeti da citokinin inhibira primordij AK potiskivanjem sinteze auksina i gena povezanih s transportom auksina u matičnim biljkama jabuke 'M.26', reznice uzgajane u mediju za ukorjenjivanje tijekom razdoblja od 3–7 dana. Istraživanje je pokazalo da je niska razina citokinina u stanicama okidač stanične biosinteze.

Stoga bi se inhibicija citokinina stvaranjem AK mogla postići smanjenjem transmisije auksinskog signala. Antagonistička interakcija između citokinina i auksina se također pokazala važnim za određivanje veličine korijenskog meristema (Mao i sur., 2018).

4. MATERIJALI I METODE

4.1 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.

4.3 Autoklaviranje i sterilizacija instrumenata

Autoklaviranje je proces koji služi za sterilizaciju destilirane vode, Magenta posuda s podlogama i zaraženog medija s izdancima (Pintarić, 2008). Instrumenti (pincete, skalpeli), laboratorijsko posuđe oprani su tekućom vodom i deterdžentom, potom su isprani destiliranom vodom. Prije upotrebe svaka Magenta posudica, Petrijeve zdjelice i ostali pribor obloženi su alumnijskom folijom i sterilizirani u autoklavu na temperaturi od 121 °C, pri tlaku od 1 bara u trajanju od 25 minuta.

4.4 Rad u laminaru

Laminar je komora u kojoj u horizontalnom smjeru protiče sterilni zrak. Prije unošenja uzoraka, instrumenata i podloga koji su neophodni za rad u laminaru potrebno je osigurati cirkulaciju sterilnog zraka barem 15 minuta prije početka rada, također potrebno je obaviti i sterilizaciju površine ruku, ali i radne površine laminara sa 96% etilnim alkoholom. Unutar laminara nalazi se i plamenik koji se pali s početkom rada u laminaru i na njemu se laboratorijski pribor prilikom premještanja eksplantata sterilizira.

4.5 Početni tretman umnažanja izdanaka jabuke

U ovome radu je kao osnovna podloga korišten Murashige i Skoog (MS) medij za multiplikaciju i zakorjenjivanje. Kao početni materijal (Slika 4.1.) korišteni su mikropropagirani izdanci jabuke sorte Gala veličine 1-1,5 cm koji su postavljeni na početni MS medij. Danas je najčešće korišteni hranidbeni mediji za mikropropagaciju jabuke upravo MS medij jer se smatra da je najučinkovitiji prilikom formiranja izdanaka.
Medij se sastojao od MS makro i mikroelemenata (Murashige i Skoog, 1962), 30 g/l saharoze, 100 mg/l mio-inozitola, 0,5 ml/l BAP-a, 1 ml/l MS vitamina i 0,05 mg/l indol-3-octene kiseline (IAA), potom se sadržaj medija prilagođava na pH=5,8 upotrebom 1N HCl ili 1N NaOH prije autoklaviranja. Nakon određivanja pH-a u medij je dodano 8 g/l Plant agara. Hranidbeni medij je

potom steriliziran u autoklavu na temperaturi od 121° C pri tlaku od 1 bara 25 minuta. Nakon sterilizacije slijedilo je izlijevanje medija u također sterilizirane Magenta posude, a potom se vrši supkultivacija izdanaka. Nakon supkultivacije Magenta posude s biljnim materijalom se inkubiraju u komori rasta 30 dana pri čemu se vrši ponovna supkultivacija nakon što dobijemo dovoljnu količinu biljnog materijala.



Slika 4.1. Mikropropagirani izdanci jabuke sorte Gala postavljeni na MS medij
(Foto: Matea Jurić)

4.6 Uvjeti u komori rasta

Razvoj i multiplikacija izdanaka i zakorjenjivanje odvijalo se pri kontroliranim uvjetima u komori rasta. Magenta posudice sa eksplantatima smještene su u komoru rasta namijenjenu za rast kulture tkiva. Temperatura u komori je bila 23,5 ± 1 °C i fotoperiod od 16 sati dan i 8 sati noć. Izvor svjetla bile su fluorescentne lampe Osram L 36W/77 uz intenzitet svjetla 40 μE $m^{-2}s^{-1}$.

4.7 Multiplikacija biljnog materijala na medijima s različitim koncentracijama citokinina 6-benzilaminopurina i meta-topolina

Nakon 30 dana na hranidbenom mediju za mikropropagaciju dobivena je dovoljna količina biljnog materijala (Slika 4.2.) kako bi se obavila ponovna supkultivacija na medije u koje su dodani meta-topolin (mT) i 6-benzilaminopurin (BAP) u različitim koncentacijama od 0,5, 1, 2, 4 i 6 mg/l, kao i kontrolni hranidbeni medij bez regulatora rasta (HFM). Medij se sastojao od MS makro i mikro soli, 30 g saharoze, 100 mg mio-inozitola, 1 ml MS vitamina i 8 g agara za 1 l medija.

Bitno je napomenuti da je BAP stabilan pri visokim temperaturama, odnosno autoklavabilan radi čega se pri dodavanju BAP-a u medij pH određuje na 5.8 prije autoklaviranja. Isto vrijedi i za HFM, dok je mT podložan gubitku aktivnosti te se dodaje nakon autoklaviranja. Radi toga je potrebno empirijski utvrditi do kojih promjena pH medija dovodi dodavanje različitih koncentracija. Nakon sterilizacije u autoklavu slijedila je ponovna supkultivacija biljnog materijala (Slika 4.3.) i to samo sa vršcima izdanaka, gdje je postavljeno po 5 vršaka u 3 magente za svaki tretman, nakon čega su kultivirani u komori rasta 30 dana pri jednakim uvjetima kakvi su ranije opisani (Slika 4.4.).

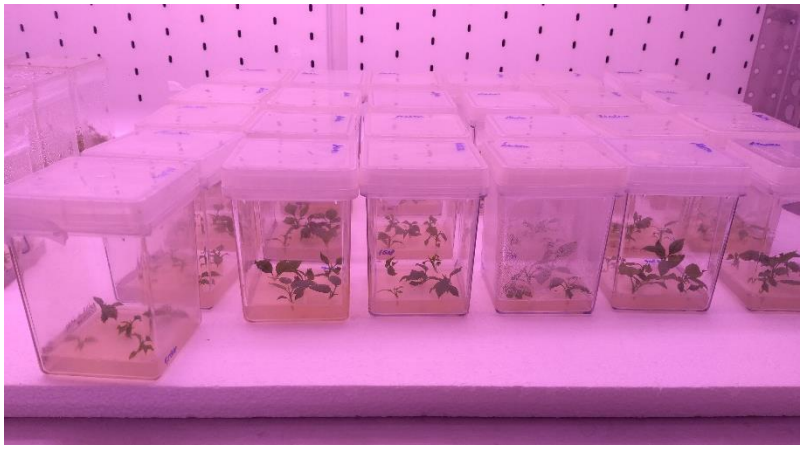
Nakon 30 dana na hranidbenom mediju s različitim koncentracijama BAP-a i mT-a analizirano je koji od njih je imao najbolji utjecaj na razvoj izdanka jabuke određivanjem stope multiplikacije i dužine razvijenih izdanaka. Stopa multiplikacije određena je prosječnim brojem izdanaka u magenti, prosječnim brojem izdanaka po svakom postavljenom vršku, te prosječnom duljinom izdanaka. Na podlogama za multiplikaciju nastojalo se vršiti umnažanje izdanaka, tj. indukcija diferencijacije novih izdanaka iz bočnih pupova.



Slika 4.2. Mikropropagirani izdanci jabuke sorte Gala nakon 30 dana na MS mediju (Foto: Matea Jurić)



Slika 4.3 Supkultivacija biljnog materijala na medije sa različitim koncentracijama BAP-a i mT-a (Foto: Matea Jurić)



Slika 4.4. Biljni materijal u komori rasta (Foto: Matea Jurić)

4.8 Zakorjenjivanje izdanaka

Nakon provedene analize svakog pojedinačnog izdanka koji je dobiven s različite koncentracije citokinina, izdanci su supkultivirani na podlogu za zakorjenjivanje. Podloga za zakorjenjivanje sastojala se od HFM medija raspodjeljenog u Erlenmeyerove tikvice. Medij se sastojao od MS soli, 30 g/l saharoze, 100 mg/l mio-inozitola, 1 ml/l matične otopine MS vitamina, te 8 g/l Plant agara. pH podloge treba biti 5,8. Nakon sterilizacije medija ½ izdanaka sa svakog tretmana uronjeno je 10 minuta u indol-3-maslačnu kiselinu koncentracije 5 mg/l, a kontrolni tretman uključivao je drugu ½ biljaka koje su bile uronjene u sterilnu vodu u jednakom trajanju.

Pouzdano se može reći da je hormonski par BAP/indol-3-maslačna kiselina najčešće korišteni par hormona u mikropropagaciji, posebno kod dikotiledonih vrsta (Pintarić, 2008.). Za svaku koncentraciju na kojoj su bile uzgajane biljke korištene su po 3 Erlenmeyerove tikvice, a u svakoj po 3 biljke. Na zakorjenjivanje su postavljani izduženi izdanci, obično ne manji od 10 mm. Poslije završene supkultivacije biljaka na medij za zakorjenjivanje, biljke su prenesene u komoru rasta na 60 dana, nakon čega je izvršena procjena broja zakorjenjenih biljaka te analiza korjenovog sustava zakorjenjenih biljaka pomoću WinRhizo softvera, gdje je odjednom skenirano 3 do 4 biljke ovisno od veličine korijena.

4.9. Aklimatizacija zakorjenjenih biljaka

Aklimatizacija je završna faza mikropropagacije i praćenja utjecaja citokinina na razvoj korijena. U ovoj fazi zakorjenjene biljke su vađene iz posuda u kojima su bile kultivirane i presađene u supstrat. Prije same sadnje korijenov sustav je ispran vodom od zaostalih čestica agara. Aklimatizacija se prvenstveno vrši s ciljem da se *in vitro* sadnice prilagode niskoj vlažnosti zraka. Supstrat u koji se prenose biljke, koje su zakorjenjene *in vitro* radi daljeg uzgoja, trebaju imati sitnu mrvičastu strukturu i dobru aeraciju.

Odmah nakon presađivanja u posude sa zemljom biljke su dobro natopljene vodom, a nakon sadnje su redovito prskane vodom radi sprečavanja iznenadnih isušivanja i održavanja visoke vlažnosti oko biljaka.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA

5.1 Uspješnost multiplikacije ovisno o citokininima

Osnovni cilj multiplikacije je dobiti što veći broj izdanaka, ali i da oni budu dovoljno veliki. Na svaku koncentraciju citokinina, po pet izdanaka je postavljeno u tri Magenta posudice, ukupno 15 izdanaka po tretmanu. Za detaljnu analizu ispitan je svaki supkultivirani izdanak uz pomoć milimetarskog bloka gdje je određen broj dobivenih izdanaka i njihova veličina.
U pokusu je bio korišten i kontrolni medij bez dodatka citokinina kako bi mogli najbolje procjeniti utjecaj svakoga citokinina i svake upotrebljene koncentracije. Iz rezultata je vidljivo da kontrolni medij ima najmanji broj dobivenih izdanaka, ali i duljinu. (Tablica 5.1.)
BAP je pokazao izuzetno dobre rezultate u pogledu stvaranja novih izdanka koji su bili brojniji u odnosu na izdanke s medija gdje je korišten mT. Povećanje koncentracije BAP-a (Slika 5.1., 5.2., 5.3., 5.4.,5.5., Tablica 5.1.) rezultiralo je povećanjem broja izdanaka do koncentracije od 6 mg/l. Najveći broj izdanaka dobiven je na koncentraciji od 6 mg/l. Duljina izdanaka povećavala se do koncentracije od 4 mg/l, ali smanjenje počinje s koncentracijom od 6 mg/l (Tablica 5.1.). Smanjenje duljine izdanaka može biti povezano s toksičnim učinkom BAP-a na biljke, zbog nakupljanja i sporog oslobađanja metabolita u druge dijelove biljke, uzrokujući inhibiciju rasta. Ovim istraživanjem može se vidjeti da je korištenje mT u manjim koncentracijama posebno 0.5 mg/l pozitivno utjecalo na broj dobivenih izdanaka (Slika 5.6., Tablica 5.1.), ali mT u koncentraciji od 1 mg/l imao je bolji učinak na duljinu izdanaka (Slika 5.7., Tablica 5.1.) nego mT u koncentraciji od 0.5 mg/l. Iz ovoga zaključujemo da korištenje BAP-a u manjim koncentracijama ima negativno djelovanje na broj, ali i duljinu izdanaka u odnosu na korištenje mT u manjim koncentracijama, međutim primjena mT u većim koncentracijama u odnosu na BAP ima negativno djelovanje na regeneraciju većeg broja izdanaka, ali i njihovu veličinu.

Bairu i sur. (2007) navode kako su istraživanjem uočili da među različitim ispitivanim koncentracijama citokinina koji su prisutni u hranjivom mediju postoje razlike u ukupnom broju izdanaka. Pri nižim koncentracijama BAP je stvorio više izdanaka, a kako se koncentracija citokinina povećavala, veći broj izdanaka uočili su kod tretmana meta-topolinom što se u ovome istraživanju pokazalo drugačije. Iako se u literaturi spominje kako bi mT trebao imati bolji učinak u odnosu na BAP prilikom multiplikacije izdanaka, u ovome istraživanju pokazalo se suprotnim.

Tablica 5.1. Razvoj izdanaka u ovisnosti o različitim vrstama citokinina i njihovim koncetracijama

Koncentracija mg/L	Prosječan br. izdanaka u magenti	Prosječan br. izdanaka po postavljenom vršku	Prosječna duljina izdanaka (mm)
BAP 0.5	23,5	4,7	13,69
BAP 1	23,6	4,7	16,12
BAP 2	26,5	5,3	16,47
BAP 4	25	5	41,04
BAP 6	29,3	5,8	11,09
mT 0,5	21	4,5	21,75
mT 1	19,6	3,9	25,67
mT 2	18,6	4	10,60
mT 4	18	3,8	11,83
mT 6	16,3	3,2	8,61
HFM	5	1	10,48



Slika 5.1. Izdanci s 0,5 mg/l BAP-a
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.2. Izdanci s 1 mg/l BAP-a
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.3. Izdanci s 2 mg/l BAP-a
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.4. Izdanci s 4 mg/l BAP-a
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.5. Izdanci sa 6 mg/l BAP-a
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.6. Izdanci s 0,5 mg/l mT
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.7. Izdanci s 1 mg/l mT
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.8. Izdanci s 2 mg/ mT
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.9. Izdanci s 4 mg/l mT
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.10. Izdanci sa 6 mg/l mT
(Foto: Matea Jurić)



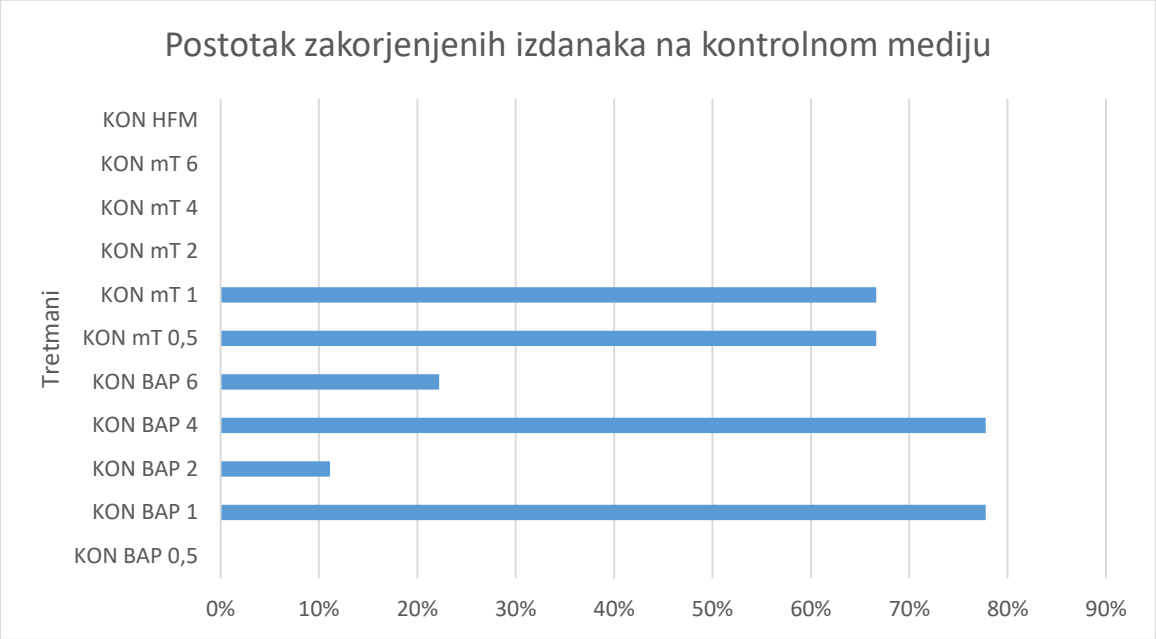
Slika 5.11. Izdanci s HFM
(Foto: Matea Jurić)

5.2 Utjecaj predtretmana citokinina na uspješnost zakorjenjivanja izdanaka i karakteristike korijena zakorjenjenih biljaka

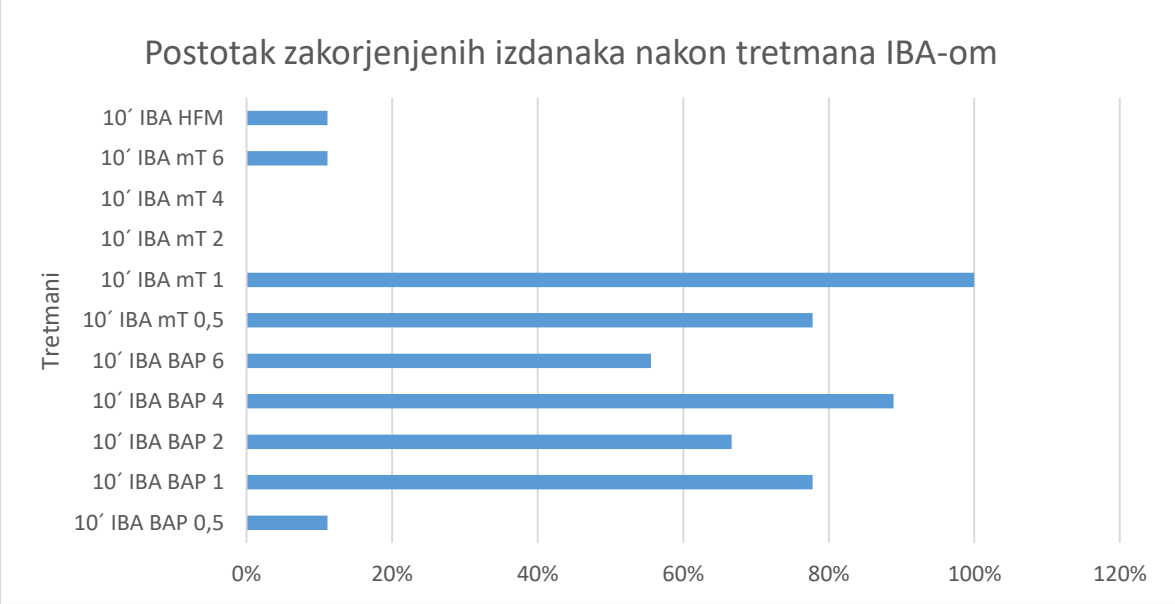
Nakon što su postavljeni izdanci na medij za zakorjenjivanje određen je broj zakorjenjenih biljaka i veličina pripadajućeg korijenja. Upravo ovaj korak omogućit će potpunu informaciju o tome koji predtretman, korišteni citokinin i koncentracija je pokazao najbolji uspjeh prilikom zakorjenjivanja.

Hipoteza koja je postavljena prije istraživanja da će se izdanci na hranidbenom mediju s dodatkom mT-a bolje razvijati, imati veću vegetativnu masu i veću stopu multiplikacije, te će se uspješnije zakorjenjivati, pokazala se točnom samo prilikom zakorjenjivanja izdanaka razvijenih na tretmanima za multiplikaciju s dodatkom mT-a u koncentraciji od 0,5 mg/l (Graf 1., Graf 2., Slika 5.16.,) do 1 mg/l (Graf 1., Graf 2, Slika 5.17.) gdje su se izdanci u najvećem postotku zakorjenili na tretmanu zakorjenjivanja uz dodatak auksina. Iz ovih rezultata vidljivo je da su izdanci jabuke bolje zakorijenili kad je u predtretmanima bila vrlo mala koncentracija mT (0,5 mg/l, u odnosu na istu koncentraciju BAP-a). Veliki broj istraživanja pokazao je da se BAP najčešće koristi u koncentraciji od 0,5-2 mg/l, gdje se pritom ostvaruju najbolji rezultati. U ovome pokusu biljke s koncentracijom 0,5 mg/l BAP-a nisu se zakorjenile. Prema nekim autorima upotreba BAP-a u većim koncentracijama može imati inhibitorno djelovanje na rast izdanaka i zakorjenjivanje, što se također pokazalo suprotnim u ovom istraživanju.

Graf 1. Postotak zakorjenjenih izdanaka ovisno o predtretmanu citokininima na kontrolnom mediju



Graf 2. Postotak zakorjenjenih izdanaka ovisno o predtretmanu citokininima nakon tretmana IBA-om



Najveći postotak zakorjenjenih biljaka dobiven je korištenjem BAP-a u koncentraciji od 1-6 mg/l i u kombinaciji s indol-3-maslačnom kiselinom i na kontrolnom mediju (Slika 5.12., 5.13., 5.14., 5.15. – Graf 1.; Graf 2). Najbolji rezultat zakorjenjivanja postignut je na mediju sa 4 mg/l BAP-a. Svi ovi podaci mogu otkriti snažnu interakciju između sadržaja citokinina (vrsta i koncentracija) u mediju za multiplikaciju izdanaka i medija za zakorjenjivanje. Ovi rezultati pokazuju da vrsta i koncentracija citokinina primijenjena prije faze zakorjenjivanja može utjecati na razvoj korijena.



Slika 5.12. Zakorjenjene biljke na kontrolnom mediju i nakon tretmana IBA-om, nakon multiplikacije izdanaka na tretmanu s BAP 1 mg/l
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.13. Zakorjenjene biljke na kontrolnom mediju i nakon tretmana IBA-om, nakon multiplikacije izdanaka na tretmanu s BAP 2 mg/l
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.14. Zakorjenjene biljke na kontrolnom mediju i nakon tretmana IBA-om, nakon multiplikacije izdanaka na tretmanu s BAP 4 mg/l
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.15. Zakorjenjene biljke na kontrolnom mediju i nakon tretmana IBA-om, nakon multiplikacije izdanaka na tretmanu s BAP 6 mg/l
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.16. Zakorjenjene biljke na kontrolnom mediju i nakon tretmana IBA-om, nakon multiplikacije izdanaka na tretmanu s mT 0,5 mg/l
(Foto: Matea Jurić)



Slika 5.17. Zakorjenjene biljke na kontrolnom mediju i nakon tretmana IBA-om, nakon multiplikacije izdanaka na tretmanu s mT 1 mg/l
(Foto: Matea Jurić)

Kako bi mogli procjeniti post-efekt citokinina na razvoj korijena svih zakorjenjenih biljaka prvo ih je potrebno skenirati, a njihove slike obrađene su WinRhizo softverom. Svi ovi podaci omogućuju nam da osim broja zakorjenjenih biljaka odredimo koja koncentracija pokazuje najbolje rezultate u pogledu dužine korijena, obujma korijena, površine i broja vrhova korijena (Tablica 5.2.).

Kako je već navedeno da bi BAP u manjim koncentracijama trebao imati bolji utjecaj prilikom zakorjenjivanja izdanaka ovim istraživanjem smo utvrdili da je BAP u manjim koncentracijama imao samo jednu zakorjenjenu biljku, pa se ovi podaci ne podudaraju s onim dobivenim iz literature, ali razvoj korijenja u koncentraciji 0,5 mg/l BAP-a pokazao se najboljim u odnosu na sve korištene koncentracije BAP-a. Također korištenjem BAP-a u većim koncentracijama, dobiven je veći broj zakorjenjenih biljaka, ali svojstva korijena su lošija u pogledu post-efekta citokinina na razvoj korijena u odnosu na manju koncentraciju BAP-a (Tablica 5.2.).
Izdanci koji su bili postavljeni na hranidbeni medij s dodatkom mT-a pokazali su manje negativno djelovanje na zakorjenjivanje pri nižim koncentracijama, dok pri većim koncentracijama nije došlo do zakorjenjivanja. Svi ovi rezultati pokazuju da je primjena mT u manjoj koncentraciji prilikom zakorjenjivanja biljaka bolja. Međutim, korištenjem BAP-a u različitim koncentracijama dobiven je veći broj zakorjenjenih biljaka. Stoga zaključujemo da u ovome istraživanju mT nije dobro reagirao u većim koncentracijama prilikom zakorjenjivanje izdanaka jabuke.

Tablica 5.2. Utjecaj korištenih citokinina u fazi multiplikacije na karakteristike korijena zakorjenjenih biljaka

TRETMAN	Dužina korijena (cm)	Površina korijena (cm^2)	Prosječni promjer (mm)	Obujam korijena ($cm^{3)}$	Broj vrhova korijena
HFM	41,74	7,41	0,56	0,10	36
mT 0,5	81,53	15,38	0,66	0,26	171,55
mT 1	34,82	7,76	0,73	0,14	62,22
mT 6	24,33	3,57	0,46	0,04	35
BAP 0,5	64,54	12,14	0,59	0,18	125
BAP 1	36,23	8,46	0,77	0,16	72,5
BAP 2	33,68	5,93	0,54	0,08	77,75
BAP 4	23,67	6,47	0,86	0,16	58,50
BAP 6	31, 17	6,29	0,66	0,10	113,2

Iako je uspješnost zakorjenjivanja izdanaka bila veća na podlozi s dodatkom BAP-a u odnosu na mT (Tablica 5.2.), dužina korijenja (81,53 cm) i površina korijenja (15,38 cm²) bila je najveća kod izdanaka multipliciranih na mediju s dodatkom mT u koncentraciji od 0.5 mg/L.

5.3.1 Utjecaj citokinina i tretmana za zakorjenjivanje na karakteristike korijena zakorjenjenih biljaka

S obzirom na to da je jedan dio izdanaka tijekom zakorjenjivanja neovisno o predtretmanima bio tretiran s indol-3-maslačnom kiselinom (Slika 5.18.), a drugi dio sa sterilnom vodom kao kontrolnim medijem, može se vidjeti utjecaj auksina IBA-e, odnosno interakcije citokinina i auksina na razvoj korijena izračunavanjem prosjeka za svako mjereno svojstvo. Različite vrste citokinina, ali i koncentracije pokazale su bolje rezultate u kombinaciji s IBA-om u odnosu na kontrolni tretman zakorjenjivanja (Tablica 5.3.).
Indol-3-maslačna kiselina (IBA) je biljni regulator rasta koji pripada auksinima, za kojeg je dokazano da stimulira rast i izduživanje stabljike i zakorjenjivanje reznica (Elhaak i sur., 2015). Osnovna svrha tretiranja reznica auksinima je povećati postotak ukorjenjivanja i razvoj korijena (Elhaak i sur., 2015). Njihova primjena također ubrzava translokaciju hranjivih sastojaka iz gornjeg dijela reznice do njihovih bazalnih krajeva povećanjem aktivnosti enzima. U ovom istraživanju tretman zakorjenjivanja je proveden kratkotrajnim uranjanjem izdanaka u veliku koncentraciju IBA-e što se iz literature smatra najboljim načinom za započinjanje ranog ukorjenjivanja, duljinu korijena i preživljavanja u poljskim uvjetima. IBA je sintetički kemijski spoj koji potiče razvoj korijenja i potiče ukorjenjivanja reznica u velikom broju biljnih vrsta i nije toksičan za biljke u širokom rasponu koncentracije (Elhaak i sur., 2015).

Najbolji rezultat u fazi zakorjenjivanja na karakteristike korijena izdanaka zakorjenjenih nakon tretmana IBA-om imao je mT u koncentraciji od 0.5 mg/l. Pretpostavka je bila da će velike koncentracije BAP-a, koje bi se zadržale u biljci, umanjiti utjecaj naknadno dodanog auksina (IBA) kojemu je svrha prije svega potaknuti zakorjenjivanje, međutim veće koncentracije BAP-a pokazale su dobre rezultate.

Ovim istraživanjem utvrđeno je da je mT u koncentraciji od 1 mg/l (Graf 2) pokazao najmanje negativno djelovanje na zakorjenjivanje u pogledu broja zakorjenjenih biljaka. S druge strane može se također vidjeti pozitivan utjecaj BAP-a na zakorjenjivanje izdanaka u koncentraciji od 1 i 4 mg/l (Graf 1.) na kontrolnom mediju, međutim pokazali su negativno djelovanje na svojstva korijena.



Slika 5.18. Izdanci na tretmanu zakorjenjivanja s IBA-om
(Foto: Matea Jurić)

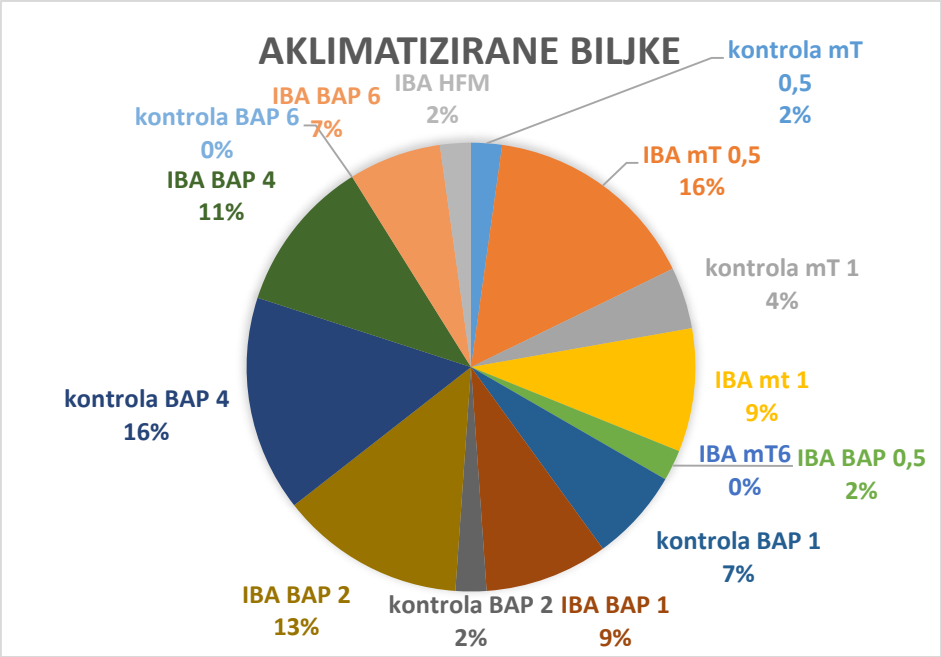
Tablica 5.3 Utjecaj korištenih citokinina u fazi multiplikacije na karakteristike korijena izdanaka zakorjenjenih nakon tretmana IBA-om/ kontrolnog tretmana zakorjenjivanja

TRETMAN	Dužina korijena (cm)	Površina korijena (cm^2)	Prosječni promjer (mm)	Obujam korijena ($cm^{3)}$	Broj vrhova korijena
IBA mT 0,5	92,95	16,52	0,58	0,24	169,28
Kontrola mT 0,5	70,10	14,23	0,74	0,27	173,83
IBA mT 1	32,53	7,28	0,70	0,13	73,44
Kontrola mT 1	37,10	8,23	0,75	0,15	51
IBA BAP 1	48,67	10,85	0,71	0,19	101,42
Kontrola BAP 1	23,79	6,07	0,83	0,13	43,57
IBA BAP 2	42,70	8,54	0,65	0,14	89,5
Kontrola BAP 2	24,66	3,32	0,42	0,03	66
IBA BAP 4	28,06	8,40	0,96	0,23	56,87
Kontrola BAP 4	19,29	4,54	0,75	0,08	60,14
IBA BAP 6	35,54	6,13	0,57	0,08	113,4
Kontrola BAP 6	26,81	6,45	0,76	0,12	113

5.4 Aklimatizacija

Iako je ova faza često kritična, veliki broj presađenih biljaka koje su prethodno bile na podlogama uz dodatak BAP-a pokazale su najbolje rezultate i aklimatizirale su se na uvjete relativno niske vlažnosti zraka, koji vladaju u vanjskim uvjetima, tj. uvjetima *ex vitro*. Najveći broj aklimatiziranih biljaka potječe s tretmana mT u koncentraciji 0,5 mg/l u kombinaciji sa IBA-om i BAP-a u koncentraciji 4 mg/l na kontrolnom mediju za zakorjenjivanje (Graf 3.). Općenito, na aklimatizaciju je pozitivnije djelovalo korištenje IBA-e u fazi zakorjenjivanja u odnosu na kontrolni tretman zakorjenjivanja.

Graf 3. Postotak aklimatiziranih biljaka ovisno o tretmanima citokininima i tretanima za zakorjenjivanje



Rezultati u ovome istraživanju pokazali su da za rast biljaka *in vitro* ne utječe samo vrsta korištenog citokinina, već je prije svega bitna odgovarajuća koncentracija citokinina. Korištenje IBA-e 10 minutnim tretmanom u koncentraciji od 5 mg/l na izdancima koji su prethodno multiplicirani na tretmanima s BAP-om u različitim koncentracijama, možemo reći da se najbolje pokazao u *in vitro* regeneraciji korijena, ali jednako tako i aklimatizaciji. Osobito su biljke s medija uz dodatak 4 mg/l BAP-a imale dobre rezultate u pogledu broja izdanaka, njihove veličine, ali i razvoja korijena, a u fazi aklimatizacije pokazale su veliku otpornost na vanjske uvjete. S obzirom da je poznato da je morfofiziološka kvaliteta sadnica izuzetno važna za uspjeh uspostavljanja biljaka u polju (de Souza i sur., 2019), možemo zaključiti da je taj tretman rezultirao razvojem najkvalitetnijih sadnica.



Slika 5.19. Aklimatizirane biljke jabuke sorte Gala
(Foto: Matea Jurić)

6. ZAKLJUČAK

Cilj ovog istraživanja bio je procjeniti učinak 6-benzilaminopurina i meta-topolina na indukciju izdanaka i zakorjenjivanje biljaka jabuke sorte Gala. Istraženi su učinci različitih koncentracija BAP-a i mT-a prilikom multiplikacije izdanaka.
Na temelju dobivenih rezultata multiplikacije, zakorjenjivanja i aklimatizacije jabuke sorte Gala zaključili smo sljedeće:

- Uspješno je proveden postupak multiplikacije izdanaka sorte Gala u *in vitro* uvjetima i to na osnovnoj podlozi MS uz dodatak različitih koncentracija BAP-a i mT-a
- Stopa multiplikacije izdanaka primjenom BAP-a je veća u odnosu na mT i povećavala se sukladno povećanju koncentracije, dok je kod mT stopa multiplikacije veća pri nižim primjenjenim koncentracijama
- Najveća duljina izdanaka postignuta je primjenom BAP-a u koncentraciji 4 mg/l
- Postotak zakorjenjenih biljaka koje su mikropropagirane na hranidbenoj podlozi s dodatkom mT-a znatno je niža (33,3%) u odnosu na zakorjenjene biljke mikropropagirane na podlozi s BAP-om (47,7%)
- Upotrijebljena tehnika multiplikacije u ovom radu bila je učinkovita i brza, pa se može široko primjenjivati u mikropropagaciji jabuke.

Sve istražene koncentracije BAP-a pokazale su da se broj izdanaka jabuke sorte Gala tijekom procesa proporcionalno povećavao do koncentracije 6 mg/l, a duljina izdanaka kao i broj zakorjenjenih i aklimatiziranih biljaka se povećavao do 4 mg/l. Međutim mT u koncentraciji od 0.5 i 1 mg/l imao je dobre rezultate, pa i visoku stopu zakorjenjivanja. Najveći postotak aklimatiziranih biljaka s mT dobiven je u koncentraciji od 0.5 mg/l koje su prethodno bile tretirane auksinima na mediju za zakorjenjivanje. Od svih istraženih medija s različitim koncentracijama najbolja indukcija izdanaka i najveći postotak aklimatiziranih biljaka jabuke sorte Gala dobiven je na podlozi s 1, 2 i 4 mg/l BAP-a.

Iz prethodnih podataka dobivenih iz literature navodi se da je mT bolji u odnosu na BAP, u smislu većeg broja izdanaka i stvaranja korijenja. Međutim, iz dobivenih podataka iz ovoga istraživanja možemo zaključiti da je utjecaj BAP-a bolji u odnosu na mT u slučaju jabuke sorte Gala.

7. LITERATURA

1. Aremu A. O., Bairu M W., Szucova L, Finnie J. F., Van Staden J. (2012). The role of meta-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated 'Williams' bananas, Journal of Plant Physiology, 1530– 1541
2. 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
3. Bašić I. (2017). Stari hrvatski voćnjaci i sorte jabuka. Leo-commerce, Rijeka
4. 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
5. Dobránszki J., Teixeira da Silva, J. A. (2010). Micropropagation of apple, Biotechnology Advances, 462-488
6. Dubravec K. D. (1996). Botanika, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
7. Dubravec K. D., Dubrave I. (1998). Kultivirane biljne vrste Hrvatske i susjednih područja, Školska knjiga, Zagreb
8. Dharaneeswara Reddy D. R., Suvarnal D., Muralidhra Rao D. (2014). Effect off 6-Benzylamino purine (6-BAP) on in vitro shoot multiplication off Grand Naine (Musa sp.), International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 36-42
9. Elhaak MA, Matter MZ, Zayed MA, Gad DA (2015). Propagation Principles in Using Indole-3-Butyric Acid for Rooting Rosemary Stem Cuttings, Journal of Horticulture, 2:1
10. Godet J. (2000). Drveće i grmlje, Naklada C, Zagreb
11. Kantoci, D. (2006). Voćarstvo. Pregledni rad
12. Khatun F., Kh. Ashraf-Uz-Zaman, Haque Rabin M. (2017). Effect of BAP and IBA on in vitro Regeneration of Local Banana Variety of Sabri, Biotechnology Journal International, 18(1): 1-10
13. Krpina, I. (2004). Voćarstvo. Nakladi zavod Globus, Zagreb
14. Magyar-Tabor K., Dobra´nszki J, Teixeira da Silva J.A., Bulley S.B., Hudak I., (2010) The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple, Plant Cell Tiss Organ Cult, 101:251–267
15. Mao J., Zhang D, Meng Y, Li K, Wang H, Han M. (2019). Inhibition of adventitious root development in apple rootstocks by cytokinin is based on its suppression of adventitious root primordia formation, Physiologia Plantarum, 663–676
16. Maria de Souza L., Ribeiro Barbosa1 M., Rafael Zárate-Salazar J., Lozano-Isla F., Rangel Camara T. (2019). Use of meta-Topolin, an unconventional cytokinin in the *in vitro* multiplication of *Opuntia stricta* Haw, Biotecnología Vegetal, 85-96
17. Nur Azimi Bin Azizan M. (2015). The Effect of BAP and NAA Treatment on Micropropagation of Cucumis sativus. L, International Journal of Science and Research

2319-7064
18. Parađiković, N. (2014). Principi floriculture, Fakultet Agrobiotehničkih znanosti, Osijek
19. Pintarić, B., (2008) Mikropropagacija bijele topole (Populus alba L.), Šumarski list, 343-354
20. 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
21. Podlesakova K, Zalabak D., Cudejkova M., Plıhal O., Szucova L., Dolezal L., Spıcha K., Strnad M, Galuszka P. (2012). Novel Cytokinin Derivatives Do Not Show Negative Effects on Root Growth and Proliferation in Submicromolar Range
22. Prerostova S., Dobrev PI., Gaudinov 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 to Drought Stress and Recovery in Arabidopsis, Frontiers in Plant Science, 9:655
23. Teixeira da Silva J., A., Gulyás A., Magyar-Tabori, K., Wang M.-R., Wang Q.-C., Dobránszki J. (2019). In vitro tissue culture of apple and other *Malus* species: recent advances and applications, Planta, 249:975–1006
24. Uche O. C., Ejiofor A. P., Eziuche O.C. (2016). Comparative Growth Rates of *Treculia africana* Decne: Embryo in Varied Strengths of Murashigeand Skoog Basal Medium, International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering, Vol:10, No:9
25. Valero-Aracama C., Kane m. E., Wilson B. S., Philman L. N. (2010). Substitution of benzyladenine with meta-topolin during shoot multiplication increases acclimatization of difficult- and easy-toacclimatize sea oats (Uniola paniculata L.) genotypes, Plant Growth Regul, 60:43–49
26. Werbrouck, S.P.O. (2010). Merits and drawbacks of new aromatic cytokinins in plant tissue culture. Acta Hortic. 865, 103–108

WEB LITERATURA:

1. https://hr.vomturmhaus.com/znacajke-uzgoja-i-pravila-za-njegu-sorte-jabuka-gala, pristup 05. 05. 2021.
2. http://www.psss.rs pristup 06.05.2021.
3. https://hr.kenkosokushin.com/what-is-the-nutritional-value-of-a-gala-apple pristup16.06.2021
4. http://www.ucanr.homeorchard.edu/ pristu 06.05.2021
5. http://homeguides.sfgate.com pristup15.06.2021
6. https://biologija-gimnazija.weebly.com/biljni-hormoni.html pristup 06.05.2021
7. https://himedialabs.com/ pristup 06.05.2021
8. http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/vocarstvo/vocne-vrste/jabuka/jesenske-sorte-jabukem pristup 12.07.2021

8. ŽIVOTOPIS

Matea Jurić rođena je 10. svibnja 1997. u Zenici. Pohađala je osnovnu školu u Žepču. Nakon završene osnovne škole upisuje srednju školu u Katoličkom školskom centru "Don Bosco" u Žepču smjer Agroturistički tehničar. Po završetku srednje škole upisuje preddiplomski studij općeg smjera agronomije na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Mostaru. Nakon završenog preddiplomskog studija upisuje se na diplomski studij Biljnih znanosti na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.