Mikropropagacija pitomog kestena (Castanea sativa Mill.)

Cvitković, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:204:032607

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

MIKROPROPAGACIJA PITOMOG KESTENA (*Castanea sativa* Mill.)

DIPLOMSKI RAD

Ivona Cvitković

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Biljne znanosti

MIKROPROPAGACIJA PITOMOG KESTENA (*Castanea sativa* Mill.)

DIPLOMSKI RAD

Ivona Cvitković, univ. bacc. ing. agr.

Mentor: prof. dr. sc. Snježana Kereša

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ivona Cvitković**, JMBAG 0178094056, rođena dana 30.09.1993. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

MIKROPROPAGACIJA PITOMOG KESTENA (*Castanea sativa* Mill.)

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVIJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Ivone Cvitković**, JMBAG 0178094056, naslova

MIKROPROPAGACIJA PITOMOG KESTENA (*Castanea sativa* Mill.)

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana

_____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. prof. dr. sc. Snježana Kereša mentor _____
2. doc. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović član _____
3. doc. dr. sc. Kristina Batelja Lodeta član _____

Zahvala

Zahvalila bih se mentorici prof. dr. sc. Snježani Kereša na vođenju i pomoći u izradi kao i pisanju ovog rada, povjerenju, strpljenju i slobodnom vremenu koje je uložila.

Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Aniti Bošnjak Mihovilović na sugestijama i pruženim savjetima.

Posebno se zahvaljujem članovima svoje obitelji koji su uvijek bili iskrena potpora i veliko ohrabrenje u svim trenucima mog školovanja i studija.

Zahvaljujem se i svom dragom Ivanu na ljubavi i podršci koju mi daje.

Hvala od srca!

Sadržaj

Sažetak **1**
Summary **2**
1. Uvod **3**
1.1. Cilj rada 4
2. Pregled literature **5**
2.1. Taksonomska pripadnost 5
2.2. Porijeklo i rasprostranjenost 6
2.3. Pitomi kesten u Hrvatskoj 8
2.3.1. Rasprostranjenost pitomog kestena u Hrvatskoj 8
2.3.2. Zdravstveno stanje pitomog kestena u Hrvatskoj 9
2.4. Morfološka svojstva pitomog kestena 11
2.4.1. Korijenov sustav 11
2.4.2. Deblo i krošnja 11
2.4.3. List 13
2.4.4. Cvijet 13
2.4.5. Plod 14
2.5. Kemijski sastav, nutritivna vrijednost i upotreba pitomog kestena 16
2.5.1. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost 16
2.5.2. Upotreba pitomog kestena 17
2.6. Agroekološki uvjeti za uzgoj pitomog kestena 20
2.6.1. Klimatski uvjeti 20
2.6.2. Edafski uvjeti 20
2.7. Razmnožavanje pitomog kestena 21
2.7.1. Generativno razmnožavanje 21
2.7.2. Vegetativno razmnožavanje 22
2.8. Mikropropagacija 24
2.8.1. Regulatori rasta citokinini 26
2.8.2. Mikropropagacija pitomog kestena 27
3. Materijali i metode **31**
3.1. Biljni materijal i sterilizacija 31
3.2. Sterilizacija pribora 31

3.3. Sastav hranidbene podloge 31
3.4. Postavljanje u kulturu in vitro i mikropropagacija 33
3.5. Statistička analiza podataka 35
4. Rezultati i rasprava 36
4.1. Uspostavljanje kulture biljnog tkiva 36
4.2. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o vrsti eksplantata 37
4.3. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o različitim citokininima 39
4.4. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o interakciji citokinina i vrste eksplantata 40
4.5. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o vrsti agara 44
4.6. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o giberelinskoj kiselini 45
5. Zaključak 46
6. Literatura 48
7. Prilog 53
Životopis 54

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ivone Cvitković**, naslova

MIKROPROPAGACIJA PITOMOG KESTENA (*Castanea sativa* Mill.)

Pitomi kesten je u Hrvatskoj devastirana vrsta zbog raka kestenove kore i truleži korijena, a posljednjih godina i novih štetočina. Sadnja novih stabla otpornijih genotipova bila bi važan pothvat. Nove sadnice moguće je proizvesti generativno, ali zbog stranooplodnje, sadni materijal u tom slučaju nije uniforman. Mikropropagacija kao metoda vegetativnog razmnožavanja nameće se kao rješenje. Cilj ovog istraživanja bio je razviti protokol za mikropropagaciju pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.). Vegetacijski vršci izolirani su pod stereomikroskopom iz aksilarnih pupova izdanaka korijena i postavljeni na uspostavni medij. U pokusima su kao eksplantati korišteni mikroizdanci (0,5 – 1 cm) ili nodalni segmenti. Ispitan je utjecaj citokinina 6-benzilaminopurina i zeatina na učinkovitost mikropropagacije. Također su ispitani učinci različitih vrsta agara i različitih koncentracija giberelinske kiseline. Nodalni segmenti dali su signifikantno veći broj izdanaka u odnosu na mikroizdanke. Međutim, dužina najdužeg izdanka i prosječna dužina izdanaka bila je signifikantno veća na mikroizdancima. Eksplantati su se značajno bolje razvili na mediju MS s koncentracijom 1,5 mg/L 6-benzilaminopurina (BAP), u odnosu na medij MS s 1,5 mg/L zeatina. Najveći broj izdanaka po eksplantatu (2,7) dobiven je iz nodalnih segmenata na MS mediju s 1,5 mg/L BAP-a. Najveća dužina najdužeg izdanka (9,5 mm) i najveća prosječna dužina izdanaka (8,9 mm) ostvarena je s mikroizdancima na mediju MS s 1,5 mg/L BAP-a.

Ključne riječi: pitomi kesten, *Castanea sativa* Mill., rak kestenove kore, mikropropagacija, regulatori rasta

Summary

Of the master's thesis - student **Ivona Cvitković,** entitled

MICROPROPAGATION OF SWEET CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.)

Sweet chestnut is a devastated species in Croatia, since it has been plagued by chestnut blight and ink disease, and in recent years new pests. Planting new trees of more resistant genotypes would be an important undertake. New seedlings can be produced generatively, but because of allogamy, the planting material in this case is not uniform. Micropropagation as a vegetative propagation method implies a solution. The objective of this study was to establish the protocol for micropropagation of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Shoot tips from axillary buds of young root shoots were isolated under stereomicroscope and placed on establishing medium. As explants either microshoots (0.5 – 1 cm) or nodal segments were used. The influence of cytokinins 6-benzylaminopurine and zeatin on microprogation efficacy was tested. The effects of different agars and different concentrations of gibberellic acid were also tested. The nodal segments had significantly higher number of shoots per explant than the microshoots. However, the length of the longest shoot and the average length of shoots was significantly higher on the microshoots. Explants developed significantly much better when propagated on MS medium 1.5 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) then on MS medium with 1.5 mg/L zeatin. The highest number of shoots per explant (2.7) was obtained from nodal segments on the MS medium with 1.5 mg/L BAP. The largest length of the longest shoot (9.5 mm) and the largest average shoots length (8.9 mm) were obtained on the microshoots on MS medium with 1.5 mg/L BAP.

Keywords: sweet chestnut, *Castanea sativa* Mill., micropropagation, chestnut blight, growth regulators

1. Uvod

Od sedamdesetih godina prošlog stoljeća, prirodni resursi diljem svijeta postupno su reevaluirani u skladu s načelima održive poljoprivrede. Pitomi kesten, *Castanea sativa* Mill., vrsta šumskog drva koja pripada porodici *Fagaceae*, također je pod utjecajem ovog procesa. Pitomi kesten ima visoku upotrebnu vrijednost u mnogim dijelovima svijeta zbog svoje gospodarske i ekološke uloge u mnogim agrošumarskim sustavima. U Europi dobiva na vrijednosti kao izvor proizvodnje visoko kvalitetnog drva i plodova visoke nutritivne vrijednosti zbog čega se ubraja u voćke. Plodovi su služili kao hrana već prethistorijskom čovjeku. Rimljani su naveli veliki potencijal pitomog kestena ne samo za proizvodnju ploda, već i uporabu kore i lista u ljekovite svrhe. Pedanius Dioscorides, grčki liječnik, farmakolog i botaničar, pripisao je pitomom kestenu ljekovita svojstva u prvoj farmakopeji *De Materia Medica*. List pitomog kestena se koristi u farmaceutskoj industriji jer sadrži taninske (trjeslovinske) droge. Ujedno je i medonosna biljna vrsta i vrlo cijenjena pčelinja paša. Pitomi kesten je i u svijetu i Hrvatskoj devastirana vrsta zbog raka kestenove kore i truleži korijena, a posljednjih godina i novih štetočina (Prgomet i sur., 2013). U najvećoj mjeri stradao je od raka kestenove kore kojeg uzrokuje gljivica *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Bolest uzrokuje raspucavanje kore, stvaranje otvorenih rana te sušenje grana i čitavih stabala.

Posljednjih se godina intenzivno radi na selekcijama domaćih populacija u svim zemljama u kojima je zastupljen. Naravno, prioriteti se daju genotipovima kvalitetnijih i krupnijih plodova sa svojstvom otpornosti na bolesti i štetnike. Sadnja novih stabala otpornijih genotipova bila bi važan pothvat. Nove sadnice moguće je proizvesti generativno, ali zbog stranooplodnje, sadni materijal u tom slučaju nije uniforman te potomstvo u potpunosti ne nasljeđuje sva željena svojstva roditeljskih genotipova. Cijepljenje je najčešća konvencionalna metoda razmnožavanja, međutim nekoliko je problema povezano s tom metodom. Rana napravljena tijekom postupka može poslužiti kao ulazna točka za nekoliko patogena, a javlja se i problem nekompatibilnosti podloge i plemke. Na temelju dosadašnjih pojedinih istraživanja, *in vitro* metoda mikropropagacije pruža pozitivne rezultate te daje uvid u visoki potencijal primjene mikropropagacije kao novog oblika razmnožavanja. Sukladno

navedenom, mikropropagacija se nameće kao rješenje i pruža adekvatnu metodu za masovnu propagaciju selekcioniranih genotipova.

1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je razviti protokol za mikropropagaciju pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) pri čemu je potrebno:

(1) Ispitati utjecaj te utvrditi razlike u učinkovitosti mikropropagacije nodalnim segmentima i mikroizdancima;
(2) Ispitati uspješnost mikropropagacije na mediju MS s različitim citokininima i njihovim koncentracijama;
(3) Ispitati utjecaj različitih vrsta agara u podlozi na uspješnost mikropropagacije;
(4) Ispitati utjecaj različitih koncentracija giberelinske kiseline u hranidbenoj podlozi na mikropropagaciju

2. Pregled literature

2.1. Taksonomska pripadnost

Pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) je listopadno drvo iz reda Fagales, porodice *Fagaceae* (bukovki) i roda *Castanea* Mill. (Tablica 1.) (Dubravec, 1996). Hrvatski narodni nazivi za pitomi kesten su: pravi kesten, šumski kesten, kestanj, kostanj, koštan, marun, gorski kesten, kostanja. U Hrvatskom biljnom imenoslovu *Nomenclator botanicus Croaticus* (Šugar, 2008) navedeni su izvori iz kojeg su narodni nazivi uzeti, odnosno krajeve ili govorna područja. Tako je narodni naziv kostajn zabilježen u Rakitju kraj Zagreba, dok se na području sjeverozapadne Istre, Lošinjskom otočju i južne Hrvatske koriste varijacije narodnih naziva: kostanja, kostanji, kestanj. Riječ kostanj je kao kestenov plod zabilježena polovicom 15. st. u kodeksu *Liber de simplicibus*, koji se čuva u knjižnici Sv. Marka u Veneciji. Ujedno je zabilježen i u rukopisnom rječniku *Erbario italiano-illirico* iz 18. st., talijanskih i hrvatskih biljnih imena isusovaca. Latinski naziv roda *Castanea* dolazi od antičke grčke riječi *kastanon* i armenske *kaskeni*, što znači kesten. Ime vrste *sativa* znači sađen, kultiviran (Umeljić, 2004).

Tablica 1. Taksonomska pripadnost pitomog kestena *Castanea sativa* Mill.

Klasifikacijska kategorija	Naziv
Carstvo	Plantae
Odjeljak	Spermatophyta
Pododjeljak	Magnoliophytina
Razred	Magnoliopsida
Podrazred	Hamamelididae
Red	Fagales
Porodica	*Fagaceae*
Rod	*Castanea* Mill.
Vrsta	*Castanea sativa* Mill.

Porodica *Fagaceae* obuhvaća 6 rodova s oko 1.000 vrsta rasprostranjenih u umjerenom, tropskom i suptropskom pojasu. U Hrvatskoj flori porodica je zastupljena s gospodarski važnim rodovima *Castanea*, *Fagus* i *Quercus*. Predstavnici navedenih rodova izgrađuju gotovo sve tipove bjelogoričnih šuma umjerenog pojasa Europe, uključujući i dio Sredozemlja (Dubravec, 1996, Grdinić i Kremer, 2009). Rod *Castanea* obuhvaća desetak vrsta od kojih su najznačajniji europski, američki, japanski i kineski kesten. Svaka vrsta ima mnogo varijeteta. U Tablici 2. prikazana je rasprostranjenost različitih vrsta kestena po kontinentima.

Tablica 2. Vrste pitomog kestena po kontinentima

Europa	Azija	Sjeverna Amerika
Castanea sativa (europski kesten)	*C. mollissima* (kineski kesten)	*C. dentata* (američki kesten)
	C. crenata (japanski kesten)	*C. pumila*
	C. seguinii	*C. ashei*
	C. henryi	*C. floridana*
	C. davidii	*C. alnifolia*

Izvor: Mencarelli, 2001. (http://www.fao.org/docrep/006)

2.2. Porijeklo i rasprostranjenost

Pitomi kesten porijeklom je iz pokrajine Anatolije u zapadnoj Aziji, odakle su ga Grci i Rimljani rasprostranili po cijeloj Europi (Ertürk i sur., 2006). Na temelju provedenog palinološkog istraživanja (Krebs i sur., 2004) navedena je prisutnost polena pitomog kestena u kasnom ledenom (glacijalnom) dobu na području Tirenske obale, sjeverozapadne Anatolije, južne Italije, južne Francuske i brežuljkaste regije duž mediteranske obale Sirije i Libanona. Nakon ledenog dobra područje se suzilo na refugijalna staništa zapadne Azije i južne Europe odakle se utjecajem čovjeka proširio i kultivirao u zemlje srednje i zapadne Europe. Na području Hrvatske introduciran je krajem rimske vladavine i tijekom turskog doba zbog visoke hranjive vrijednosti ploda (Prgomet i sur., 2013).

Današnja prirodna rasprostranjenost pitomog kestena je na području južne Europe, te se od Španjolske, preko Francuske, Italije, Balkanskog poluotoka i zapadne Azije, prostire sve do Kaspijskog mora (Prgomet i sur., 2011). Na Slici 1. prikazana je prirodna rasprostranjenost pitomog kestena (označeno zelenom bojom) i područja na kojima je introduciran i kultiviran tijekom povijesti (označeno narančastom bojom). Najveće površine pitomog kestena su u Francuskoj (1.020.500 ha), Italiji (765.837 ha) i Španjolskoj (137.627 ha) (Conedera i sur., 2004). Raste kao šumsko drvo i mjestimično izgrađuje čiste kestenove šume. Češće raste u zajednici s hrastom kitnjakom na različitim visinskim područjima od 400 do 1.650 metara nadmorske visine (Maurer i Fernández-Lopez, 2001). Maksimalna nadmorska visina pri kojoj pitomi kesten uspijeva je 1.800 m (Khela, 2013).



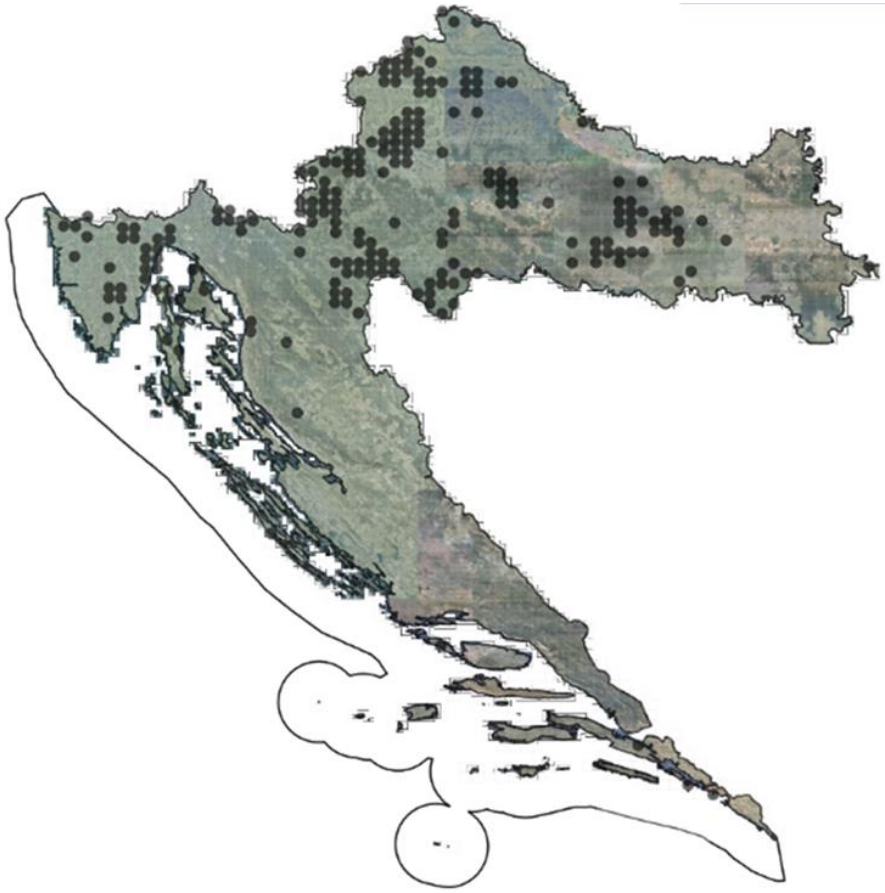
Slika 1. Rasprostranjenost pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill) u Europi i zapadnoj Aziji

Izvor: https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/forestry/qr-tree-project/sweet-chestnut

2.3. Pitomi kesten u Hrvatskoj

2.3.1. Rasprostranjenost pitomog kestena u Hrvatskoj

U Hrvatskoj pitomi kesten raste samoniklo u umjerenim i toplijim unutrašnjim i primorskim područjima. Tvori posebnu šumsku zajednicu s hrastom kitnjakom (*Querco-Castanetum illyricum* Horv.), hrastom meduncem (*Querco-Castanetum submediterraneum*) i bukvom. Šuma hrasta kitnjaka i pitomog kestena (*Querco-Castanetum illyricum* Horv.) pretežno se nalazi na kiselom tlu, južnih padina brdskog područja i izgrađuje najveće komplekse na Zrinskoj i Petrovoj gori, Medvednici i u gorju sjeverozapadne Hrvatske. Najbrojnija staništa pitomog kestena na primorskom području su na obroncima Učke, oko Pule, Buzeta, Kaštela, Rijeke, Lovrana i Opatije gdje se odavno cijepi plemkama maruna (Bučar, 2008). Manje površine kestenovih šuma s kitnjakom nalaze se na otocima Krku i Cresu (Slika 2.) (Nikolić, 2018).



Slika 2. Rasprostranjenost pitomog kestena u Republici Hrvatskoj
Izvor: Nikolić, 2005

Šumske površine u Hrvatskoj u kojima je pitomi kesten zastupljen u postotku 0 – 100 % zauzimaju 135.836,95 ha. Sastojine šuma hrasta kitnjaka, graba, bukve i pitomog kestena kao sporedne vrste (zastupljenost 10 – 100 %) nalaze se na 37.362 ha. To su uglavnom autohtone šume, a manji dio sađen je u prošlom stoljeću, ponajviše oko Karlovca (Novak Agbaba i sur., 2000). Na 15.000 ha rasprostiru se šume u kojima je pitomi kesten glavna drvenasta vrsta, od čega je 53,5 % površina u državnom, a 46,5 % u privatnom vlasništvu. U Tablici 3. prikazana je ukupna površina pitomog kestena po podružnicama Uprave šuma (UŠ) u Republici Hrvatskoj. Najveći udio kestenovih šuma nalazi na području UŠ podružnice Sisak 7.324,75 ha (48,8 %), na području UŠ podružnice Karlovac (31,7 %) i Zagreba (15,0 %) (Prgomet i sur., 2013).

Tablica 3. Ukupne površine kestena po uprava šuma podružnicama u Hrvatskoj

Uprava šuma - podružnica	Državne šume (ha)	Privatne šume (ha)	Ukupno (ha)
Požega	149,00	70,17	219,17
Bjelovar	1,80	0,00	1,80
Koprivnica	15,50	311,51	327,01
Zagreb	394,02	1.850,73	2.244,75
Sisak	6.214,26	1.110,62	7.324,75
Karlovac	1.121,59	3.629,33	4.750,92
Buzet	131,70	0,00	131,70
Ukupno	**8.027,87**	**6.972,36**	**15.000,23**
Udio (%)	**53,5**	**46,5**	**100,0**

Izvor: Prgomet i sur., 2011.

2.3.2. Zdravstveno stanje pitomog kestena u Hrvatskoj

Pitomi kesten je u Hrvatskoj devastirana vrsta zbog raka kestenove kore (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.) i truleži korijena (*Phytophthora cinnamomi*), a posljednjih godina i novih štetočina poput kestenove ose šiškarice (*Dryocosmus kuriphilus*). U najvećoj mjeri stradao je od raka kestenove kore kojeg uzrokuje gljivica

Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr. koja je tijekom prvog svjetskog rata prenesena iz SAD u Europu. Bolest uzrokuje oštećenje debla, raspucavanje kore, stvaranje otvorenih rana te sušenje pojedinih grana i čitavih stabala (Slika 3). Bolest je prvi put primijećena u Hrvatskoj na području Istre 1955 godine. Skupina znanstvenika i specijalista za invazivne vrste (eng. *The Invasive Species Specialist Group*, ISSG) u sklopu udruženja za svjetsku konzervaciju (eng. *The International Union for Conservation of Nature*, IUCN) uvrstila je gljivicu *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. na popis 100 svjetskih najgorih invazivnih vrsta organizama kao najveća prijetnja bioraznolikosti. Tijekom 1980-ih godina u Hrvatskoj, pojavom hipovirulentnog soja gljivice *Cryphonectria parasitica*, uočeno je spontano zacjeljivanje rana raka kao i površinske nekroze. Hipovirulentan soj gljivice *C. parasitica* je uzročnik neletalnog površinskog raka, te svojim djelovanjem i prijenosom hipovirulence na aktivni rak umanjuje zarazu. Posljedično tome, dolazi do pojave prirodne biološke kontrole raka kore te se unošenjem hipovirulentnih sojeva u šume pospješuje zacjeljivanje i kalusiranje rana raka na stablima (Novak Agbaba i sur., 2005; Prgomet i sur., 2011).



Slika 3. Rak kestenove kore

Izvor:https://www.agroklub.com/hortikultura/bolesti-i-stetnici-pitomog-kestena/6120/

Analizom zdravstvenog stanja na području Šumarije Petrinja, zabilježeno je 22,5 % stabala s aktivnim rakom, 12,9 % s površinskom nekrozom, 20,1 % s kalusirajućim rakom, 31,4 % suhih i svega 12,9 % zdravih stabala (Bučar, 2008). Na temelju provedenog istraživanja Novak Agbaba i sur. (2000) navode prisutnost raka kestenove kore u svim kestenovim sastojinama Hrvatske. Na području UŠ Sisak

zabilježeno je 9,63 – 15,07 % stabala s površinskom nekrozom, UŠ Zagreb 5,55 – 25,58 %, UŠ Karlovac 19,76 – 35,42 %, a u UŠ Buzet 10,38 – 20,59 %. Zaštita pitomog kestena je skup i dugotrajan posao, te je osnivanje Radne skupine za zaštitu pitomog kestena u Sisačko-moslavačkoj županiji i Centra za kesten i šljivu u Petrinji, veliki pomak na planu gospodarenja i njegove zaštite. Uz stručnjake iz Hrvatskih šuma, Šumarskog instituta i Šumarskog fakulteta, u Radnoj skupini su i predstavnik Ministarstva za zaštitu okoliša i Ministarstva poljoprivrede, stručnjaci iz šumarstva, voćarstva, pčelarstva i predstavnici gospodarstva (Bučar, 2008).

2.4. Morfološka svojstva pitomog kestena

2.4.1. Korijenov sustav

Korijen pitomog kestena je veoma jak i vigorozan, posebice onaj razvijen generativno, iz sjemena. Žila srčanica prodire i do 6 metara duboko u tlo i daje mogućnost vrlo brzog razvoja same biljke i dobro podnašanje suše. Korijenov sustav, osim primarnih skeletnih žila, čini i sekundarno postrano korijenje na kojem se razvijaju korijenove dlačice koje imaju ulogu apsorpcije vode i hranjiva iz tla. Tijekom prve dvije godine rasta brže se razvija korijenov sustav od nadzemnog dijela biljke. Tek od treće godine se znatno brže počinje razvijati nadzemni dio, odnosno stablo i krošnja (Prgomet i sur., 2013).

2.4.2. Deblo i krošnja

Ovisno o ekološkim uvjetima, ekspoziciji terena i razmaku sadnje deblo pitomog kestena može biti različitih visina i promjera (Slika 4.). Na nagnutim terenima i gušćim sklopovima deblo je duže i tanje. S obzirom na visinu, može biti nisko do 150 cm, srednje visoko 150 – 200 cm i visoko preko 200 cm (Prgomet i sur., 2013). Stablo pitomog kestena je visoko 20 – 30 m, ali može dosegnuti i do 40 m visine s prsnim promjerom do 4 m (Slika 5.). Kora je u početku glatka i tanka, sa svjetlijim lenticelama, maslinastosmeđa, a kasnije sivkastosmeđa i uzdužno izbrazdana.

Krošnja je u šumskim sastojinama uska i izdužena, dok je na usamljenim stablima i plantažnim nasadima široka i visoka. Na primarnim granama se formiraju sekundarne grane koje su nosioci rodnih grana, odnosno jednogodišnjih izboja nastalih iz pupova formiranih u prethodnoj vegetaciji. Izbojci su crvenkastosmeđi, s brojnim sitnim, svjetlijim lenticelama. Pupovi su okruglasto jajasti, malo šiljasta ili tupa vrha, crvenkastosmeđi i pokriveni s 2 – 3 ljuske (Grdinić i Kremer, 2009). Iz adventivnih, spavajućih pupova debla, skeletnih grana, korijenovog vrata i korijena razvijaju se nerodni izboji. Ti pupovi se aktiviraju prilikom oštre rezidbe uklanjanjem cijelog stabla ili osnovnih grana, što rezultira velikim brojem izdanaka i izboja. S obzirom na to da je pitomi kesten poput masline i smokve izrazito bazitona biljka, veliki broj izdanaka koji se razvija prilikom oštećenja ili odstranjivanja debla omogućuje brzu regeneraciju i pomlađivanje stabla (Prgomet i sur., 2013).



Slika 4. Deblo pitomog kestena
Izvor: http://www.permacultureeden.com/2014/11/castanea-sativa-sweet-chestnut/



Slika 5. Pitomi kesten
Izvor: https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/forestry/qr-tree-project/sweet-chestnut

2.4.3. List

Listovi pitomog kestena su naizmjenični te se sastoje od lisne peteljke i plojke čije dimenzije ovise o sortama i kondiciji stabla. Listovi su eliptično duguljasti 8 – 25 cm dugi, 4 – 8 cm široki, a lisna peteljka je duga 0,5 – 3 cm (slika 6.). Lisna plojka je šiljasta ili ušiljena vrha, nazubljena ruba, polukožasta, s gornje strane sjajna i tamnozelena, s donje strane svijetlozelena, u početku zvjezdasto dlakava, kasnije gola, uz žile posuta ljuščicama poput prhuti. Pitomi kesten lista u svibnju (Grdinić i Kremer, 2009; Hulina, 2011).

2.4.4. Cvijet

Pitomi kesten je jednodomna biljna vrsta, koja na jednogodišnjim izbojima ima odvojene aktinomorfne muške i ženske cvjetove (Slika 6.). Muški cvjetovi su u grupicama po 3 ili više, sakupljeni u blijedožućkaste, uspravne 10 – 30 cm duge prividne klasove s dlakavim vretenom. Cvijet ima šesterodijelnu čašku i 7 - 14 prašnika, svaki sa 4 polenove vrečice. Pri bazi muških cvatova nalaze se ženski cvjetovi, a ponekad i hermafroditan muški cvijet sa zakržljalim tučkom (Prgomet i sur., 2013). Ženski cvjetovi se sastoje od 6 (do 12) plodnih listova i šesterodijelne podrasle plodnice. Obično je 3 – 7 cvjetova sakupljeno u glavičasti cvat koji je obavijen zajedničkim zelenkastim ovojem, odnosno kupulom iz koje se kasnije razvija ježica (Domac, 2002). Kupula (ježica) nastaje bujanjem cvatne osi, te je u zrelom stanju kuglasta, žuta i promjera 5 – 6 cm. Obrasla je oštrim, žutosmeđim, ježasto stršećim iglastim bodljikama. Otpada čitava ili puca poprečnim šavovima na 2 – 4 dijela. Oprašivanje pitomog kestena je anemofilno i entomofilno, te je privlačenje pčela i drugih kukaca pospješeno jakim mirisom, žutim ocvijećem i prašnicima, ljepljivim peludom i njuškama (Nikolić, 2013). Cvatnja se odvija od početka lipnja, kad su listovi potpuno razvijeni i traje oko 20 dana (Hulina, 2011).



Slika 6. Morfološki prikaz pitomog kestena
Izvor: https://commons.wikimedia. org/wiki/Castanea_sativa

2.4.5. Plod

Plod pitomog kestena je orah, koji se nalazi u okruglastoj kupuli obrasloj oštrim, stršećim iglastim bodljikama koja puca na 4 dijela. Kupula je u početku sočna i sazrijevanjem ploda odrveni (Slike 7 i 8.). U kupuli se najčešće razvijaju po 3 ploda, rjeđe 2 ili samo 1. Oblik ploda ovisi o broju plodova u kupuli. Ukoliko se razvije samo 1 plod onda je okrugao, a ako su 2 ploda tada su oba zaokruženog oblika. U slučaju kada su razvijena 3 ploda, unutrašnji je spljošten, a krajnja dva polukuglasta (Slika 8.). Plod se sastoji od sjemenke i ljuske (perikarpa), pelikule (epiderma) i jezgre (mezokarpa). Jezgra i pelikula čine oko 95 % ploda (Prgomet i sur., 2013). Plod je na površini sjajan, crvenkastosmeđi, odozdo s velikom, blijedom pjegom i obavijen kožastim, s unutarnje strane vunasto dlakavim ovojem. Plodovi dozrijevaju u listopadu i studenom (Grdinić i Kremer, 2000).



Slika 7. Nezreli plod u kupuli
Izvor:https://commons.wikimedia.org/wiki/Castanea_sativa



Slika 8. Zreli plodovi u raspucaloj kupuli
Izvor: FAO, 2012

Veličina ploda je 2 – 3,5 cm, a masa jednog ploda 3 – 22 grama i ovisi o sortnim svojstvima, broju plodova u kupuli i ekološkim uvjetima, a jedno drvo kestena može dati 200 kg plodova (Hulina, 2011). U Tablici 4. prikazana je podjela plodova s obzirom na krupnoću ploda.

Tablica 4. Podjela plodova kestena s obzirom na krupnoću ploda

Vrlo krupni	> 11,76 g/plod ili <85 kom./kg
Krupni	11,76 – 10,0 g/plod ili 85 – 100 kom./kg
Srednje krupni	10,0 – 6,67 g/plod ili 100 – 150 kom./kg
Sitni	6,67 – 5,0 g/plod ili 150 – 200 kom./kg

Izvor: Prgomet i sur., 2013.

2.5. Kemijski sastav, nutritivna vrijednost i upotreba pitomog kestena

2.5.1. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost

Plod pitomog kestena ima visoku nutritivnu vrijednost. Za razliku od plodova s visokim udjelom masti poput oraha, lijeske i badema, glavni sastavni dio kestena su ugljikohidrati (50 – 60 %) i nizak udio masti (2 – 4 %). Energetska vrijednost 100 g sirovog očišćenog ploda iznosi 820 kJ (200 kcal) (USDA, 2018). Plod sadrži vodu (50 %), šećere (20 – 32 %), dijetalna vlakna (4 – 10 %), bjelančevine (4 – 7 %) i pepeo u tragovima. Bogat je mineralnim tvarima poput kalija, fosfora i magnezija te u manjim količinama sadrži i Ca, Fe, Mn, Cu, Zn, Na. Od vitamina najznačajniji su retinol (A), kompleski vitamina B; tiamin (B1), niacin (B3), pantonenska kiselina (B5), piridoksin (B6), vitamini E i C (askorbinska kiselina). Vitamini zastupljeni u plodu pitomog kestena posjeduju antioksidativna svojstva. Izvor antioksidansa uz vitamine su karotenoidi i fenolni spojevi galne i elaginske kiseline (De Vasconcelos i sur., 2010; Wanni i sur., 2017). Oksidativni stres je uzročnik mnogih kroničnih degenerativnih bolesti, stoga konzumacija antioksidansa, poput onih prisutnih u kestenu, može prevenirati oštećenje molekula proteina i molekula slobodnih radikala DNA (Nackz i Shahidi, 2006). Plod pitomog kestena je dobar izvor esencijalnih masnih kiselina a posebice mononezasićenih masnih kiselina, koje djeluju na smanjenje razine kolesterola u krvi i prevenciju kardiovaskularnih oboljenja. Prisutnost disaharida može izazvati fermentaciju u ljudskom crijevu, što daje osjećaj nadutosti (Mencarelli, 2011; Wani i sur., 2017). U sklopu glavnih aktivnih sastavnica prisutnih u plodu nalazi se visok udio tanina. Tanini (trijeslovine) su derivati fenola i fenilkarboksilinih kiselina topivi u vodi i etanolu. Štite tkivo od mikroorganizama i prisutni su u manjoj ili većoj količini u staničnom soku gotovo svih biljnih stanica. Često su ograničeni na posebne stanice parenhimskog ili produženog oblika u kojima se onda nalaze i u većim količinama. Prema kemijskoj strukturi tanini se dijele na kondenzirane ili katehinske i tanine koji mogu biti hidrolizirani. Katehinske tanine sadrži, primjerice hrast kitnjak i hrast lužnjak. Kod pitomog kestena ponajviše su prisutni u kori i drvu, te u manjim količinama u listu i unutrašnjosti ljuske ploda, te daju gorkast i opor okus (Grdinić i Kremer, 2009).

2.5.2. Upotreba pitomog kestena

Pitomi kesten je gospodarski vrlo značajna vrsta zbog višestruke uporabne vrijednosti gotovo svih dijelova biljke (drva, kore, lista, cvijeta i ploda). Rimljani su prvi naveli veliki potencijal pitomog kestena ne samo za proizvodnju ploda, već i uporabu kore i lista u ljekovite svrhe. Pedanius Dioscorides, grčki liječnik, farmakolog i botaničar, pripisao je pitomom kestenu ljekovita, adstringentni, antitoksična, antioksidativna i antibakterijska svojstva u prvoj farmakopeji *De Materia Medica*. List pitomog kestena se koristi u farmaceutskoj industriji jer sadrži taninske droge koje imaju adstringentni učinak. Adstrigensi iz tkiva vežu vodu, izazivaju stezanje tkiva, smanjuju sekreciju, učvršćuju sluznicu, pomažu kod opeklina i djeluju protuupalno (De Vasconcelos i sur., 2010). List pitomog kestena se primjenjuje u biljnim pripravcima s učinkom na kožu za liječenje rana i čireva. List se koristi i u pripravcima za liječenje kašlja i prehlade, odnosno u antitusicima. Antitusici su sredstva koja djeluju na centar za kašalj, te smanjuju, ublažuju, ili suzbijaju neproduktivan, nadražajni kašalj. Međutim bitno je napomenuti da pitomi kesten nije oficijalna droga, te nije uvršten kao ljekovita droga u Hrvatsku i/ili Europsku farmakopeju. Sukladno navedenom, uporaba biljaka u ATK (anatomsko-terapijsko-kemijski sustav lijekova) indeksu ne mora uvijek značiti da su one doista i djelotvorne kod liječenja oboljenja i poremećaja. Uporaba lijekova biljnog podrijetla uvijek nosi određeni rizik (Grdinić i Kremer, 2009).

Drvo pitomog kestena je u tehničkom pogledu odlične kvalitete, veoma čvrsto, trajno i lako za obradu. Upotrebljava se za drvenu građu, izradu stolarije i namještaja, izradu čamaca, pragova na željezničkoj pruzi te za izradu visokokvalitetnih bačvi za čuvanje vina i piva. U poljoprivredi, u području uzgoja vinove loze i hmelja, „kolje“ od kestena koristi se kao potporanj (Hulina, 2011).

Pitomi kesten se zbog nutritivne vrijednosti i kvalitete ploda široko upotrebljava u ishrani te se ubraja u voćke. Ispečeni ili kuhani plodovi vrlo su ukusno jelo, posebice oni od velikih, oplemenjenih vrsta (maruni) (Slike 9. i 10.). Tijekom povijesti, plodove samoniklog pitomog kestena prerađivalo se u brašno, koje je imalo veliko značenje u prehrani siromašnijih slojeva stanovništva. Kestenovo brašno karakterizira visok sadržaj šećera koji se stvara u osušenom plodu, te se upotrebljava prilikom izrade kruha, žganaca i kolača. Zemlje u kojima je najviše zastupljena industrijska prerada

plodova su Francuska, Španjolska i Italija. Svjetsko tržište nudi širok asortiman gotovih proizvoda poput svježih oguljenih plodova, sušenih plodova u staklenkama, kesten pirea, kreme, kestena u sirupu, marmelade, brašna, pahuljica, glaziranih kestena, slatkiša i još mnogih drugih proizvoda na bazi kestena (Slika 11.). U Japanu se pripravlja alkoholno piće od kestena, u Francuskoj i Italiji razni likeri, na Korzici pivo i u Koreji bezalkoholna pića. Iz listova uz dodatak limunskog soka može se prirediti ukusan napitak kao zamjena za ruski čaj (Grlić, 2005; Prgomet i sur., 2011). Za komercijalne svrhe utvrđene su četiri kategorije plodova:

(1) AAA manje od 48 plodova/kg,
(2) AA od 48 do 65 plodova/kg,
(3) A od 65 do 85 plodova/kg i
(4) B više od 85 plodova/kg.

Plodovi promjera manjeg od 26 mm koriste se za industrijsku preradu, a krupniji se odvajaju i sortiraju za svježu potrošnju. Prednosti imaju maroni zbog organo-leptičkih svojstava. Sorte europsko-japanskih hibrida poput Bouche de Betizac, Maraval, Marsol, Marigouele danas su među najtraženijim za podizanje suvremenih plantažnih nasada (Prgomet i sur., 2013).



Slika 9. Pečeni pitomi kesten
Izvor: https://goo.gl/images/xUSZNy



Slika 10. Kinesko jelo s kuhanim kestenima i slatkom piletinom
Izvor: https://goo.gl/images/Yw1UGe



Slika 11. Glazirani maruni

Izvor: https://goo.gl/images/SEYiYg

Pitomi kesten je i medonosna biljna vrsta i vrlo cijenjena pčelinja paša. Cvjeta sredinom lipnja kada se završi vrcanje bagremovog meda, pa se selidbom košnica može u potpunosti iskoristiti paša ove biljke. U odnosu na druge biljne vrste, pitomi kesten producira najviše peludi (Bačić i Sabo, 2007). Najveći dnevni unosi mogu biti do 5 kg. Ukupan unos po jednoj košnici može biti 40 kg, odnosno 20 kg meda za vrcanje, a s površine od 1 ha dobiva se oko 100 - 250 kg meda (Umeljić, 2004). Med pitomog kestena je tamnožut, intenzivnog mirisa, trpkog do gorkog okusa te ostaje oko mjesec dana u tekućem stanju nakon čega kristalizira. Smatra se ljekovitim za bolesti jetre i peptički ulkus (čir ili vrijed na želucu). Nedavna istraživanja navode značajan sadržaj spojeva s antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima, poput fenola, flavonoida i alkaloida (De Vasconcelos i sur., 2010). Kestenov med je visokokvalitetan izvozni proizvod pčelarstva iz Hrvatske na europsko tržište. Prinos meda znatno ovisi o mikroklimatskim uvjetima pojedinih lokaliteta i zdravstvenom stanju šuma. Zbog oboljenja od raka kestenove kore i sušenja kestenovih šuma, pčelari u Hrvatskoj gube jednu dragocjenu pašu (Bučar, 2008).

2.6. Agroekološki uvjeti za uzgoj pitomog kestena

2.6.1. Klimatski uvjeti

Pitomi kesten je heliofitna biljna vrsta, samonikla u mezofilnim i umjereno termofilnim, acidofilnim šumama brdskog i brežuljkastog pojasa, kontinentalnih i primorskih krajeva. Najviše mu odgovara mediteranska i submediteranska klima sa srednjom godišnjom temperaturom 10 – 16 °C. Može izdržati temperature i do -35 °C tijekom mirovanja vegetacije. Uspješna proizvodnja pitomog kestena je najbolja između -20 °C i 40 °C. S obzirom da pitomi kesten kasno cvate nema problema s kasnim proljetnim mrazovima koji čine povelike štete na ostalim voćnim vrstama. Međutim, u kontinentalnim područjima rane jesenske niske temperature mogu utjecati na dozrijevanje plodova i jednogodišnjih izboja (Dubravec, 1996; Prgomet i sur., 2013). Pitomi kesten raste na područjima s 800 – 1.600 mm godišnjih oborina i zahtjeva veću količinu vlage u zraku. Povoljne uvjete za rast i razvoj stvaraju veće vodene površine (veće rijeke, jezera i more) jer utječu na manje dnevne i godišnje amplitude temperaturama i povećavaju vlagu zraka. Pitomi kesten raste na južnim i zapadnim obroncima od 100 do 1.200 m nadmorske visine (Hulina, 2011). Na mediteranskom području uspijeva do 900 m nadmorske visine ako su blaži nagibi. Vrlo je osjetljiv na maglu i nagle pljuskove. Nepovoljno je i jače strujanje suhog zraka jer isušuje tučak, smanjuje oplodnju, te povećava evapotranspiraciju (Šimić, 1980). Posljedično tome, umanjuje se vegetativni porast i razvoj plodova, posebice na stablima koja su uzgojena na plitkim tlima bez mogućnosti navodnjavanja (Umeljić, 2004; Prgomet i sur., 2013).

2.6.2. Edafski uvjeti

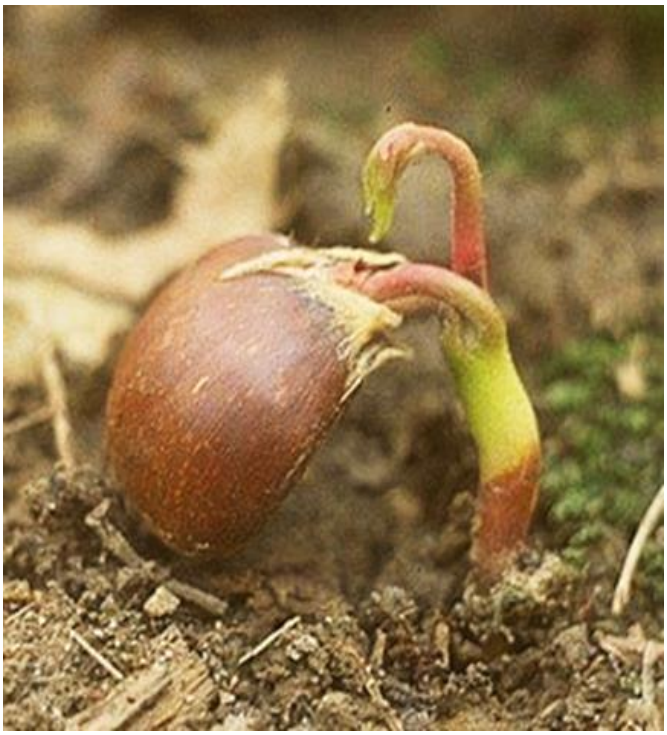
Pitomi kesten je acidofilna biljna vrsta. Raste na dubokim, kiselim, silikatnim tlima, i tlima ilovasto-glinaste strukture. Vapnenasta tla uglavnom izbjegava (kalcifugna vrsta), raste jedino u slučaju ako je došlo do dekalcifikacije dubljih slojeva tla (Domac 2002; Grdinić i Kremer, 2009). Preferira aerirana, rastresita duboka, plodna i umjereno vlažna tla na kojima se ne zadržava visoka razina podzemnih voda. Optimalan pH tla je od 4,0 do 6,0 (Prgomet i sur., 2013).

2.7. Razmnožavanje pitomog kestena

Pitomi kesten je moguće razmnožavati generativnim putem izravnom sjetvom sjemena odnosno presadnicama, vegetativnim putem izdancima, stabljičnim reznicama i cijepljenjem te *in vitro* metodom mikropropagacije.

2.7.1. Generativno razmnožavanje

Razmnožavanje pitomog kestena sjemenom (Slika 12.) bilo je dugo vremena jedini način razmnožavanja zbog poteškoća u uzgoju cijepljenih sadnica na otvorenom i prisustva tanina u drvu. Tanin brzo oksidira te je neophodno vrlo brzo obaviti cijepljenje. Ujedno zbog stranooplodnje sadni materijal nije uniforman te potomstvo u potpunosti ne nasljeđuje sva željena svojstva roditeljskih sorata. Danas se generativni način razmnožavanja koristi u svrhu proizvodnje sjemenjaka, koji služe kao podloge za cijepljenje sorata. Uspješnost klijavosti definirana je okolišnim uvjetima i genetskim svojstvima, stoga je potrebno stratificirati plodove (Prgomet i sur., 2013). Stratificirani plodovi se siju u supstrat te nakon klijanja u posude. Na temelju istraživanja (Cicek i Tilki, 2007) utvrđen je učinak veličine ploda na klijavost i razvoj sadnica pitomog kestena. Veliki plodovi (> 8 g) su ranije klijali i pokazali značajno bolju klijavost od malih plodova. Također je utvrđena veća visina i promjer sadnica nastalih iz većih plodova. Uspješnost proizvodnje sadnica generativnim načinom razmnožavanja tijekom jedne godine iznosi 70 – 80 % (Prgomet i sur., 2013).



Slika 12. Klijanje pitomog kestena

Izvor: http://imagessvt.free.fr/ physioV/germination/germination.htm

2.7.2. Vegetativno razmnožavanje

Vegetativan način razmnožavanja zasniva se na vrlo jako izraženoj sposobnosti regeneracije odnosno mogućnosti obnavljanja izgubljenih organa ili dijelova biljke ili u potencijalnoj mogućnosti za razvojem nove jedinke iz pojedinih dijelova biljke. Reznicama se dobije homogen genetski materijal, jedinke koje su karakterizirane jednakim svojstvima kao i majčinska biljka. Vegetativno razmnožavanje pitomog kestena vrši se pomoću zelenih, poluzrelih i zrelih reznica u kontroliranim uzgojnim uvjetima poput temperature supstrata, temperature zraka i relativne vlage. Pri postavljaju reznica u supstrat potrebno je voditi računa o polarnosti reznica. Polarnost kod reznica ima fiziološko značenje, te će reznice na bazalnom tj. donjem dijelu razviti korijen, a na apikalnom tj. gornjem dijelu izdanka lišće (Dubravec, 1996). Primjenom različitih koncentracija fitohormona auksina indol-3-maslačne kiseline (eng. *Indole-3-butyric acid*, IBA) i 1-naftalenoctene kiseline (eng. *1-Naphthaleneacetic acid*, NAA) može se ubrzati zakorjenjivanje reznica. Do sada su provedena mnogobrojna znanstvena istraživanja fokusirana na vegetativno

razmnožavanje kako bi se zadovoljila potražnja za elitnim genotipovima sa svojstvom otpornosti na bolesti, visokokvalitetnog drva i ploda (Vieitez i sur., 2007). S obzirom da je pitomi kesten biljna vrsta koja teško ukorijenjava, konvencionalna metoda razmnožavanja pitomog kestena vegetativnim putem odnosno reznicama nije doživjela velika primjenu u rasadničarstvu (Prgomet i sur., 2013).

Cijepljenje je najčešća konvencionalna metoda razmnožavanja pitomog kestena. Za cijepljenje potrebno je imati zdrav i kvalitetan repromaterijal: podlogu i plemku. Stoga je bitno osnivati matičnjake dobrog zdravstvenog stanja kako bi se uspješno mogao proizvoditi kvalitetan sadni materijal. Plemke s matičnih biljaka se uzimaju tijekom siječnja i veljače te se spremaju u komore s vlagom zraka iznad 80 % i temperaturom od 0 °C. Vrijeme cijepljenja podloga ovisi o pupu. Cijepljenje na spavajući pup obavlja se krajem kolovoza i početkom rujna, a na budni pup početkom vegetacije druge godine. Cijepljenje pod koru ili engleskim spojem se vrši početkom vegetacije u proljeće. Sadnice se presađuju u kontejnere i njeguju tijekom vegetacije. Za sadnju su najbolje dvogodišnje sadnice s već formiranom krošnjom i dovoljno razvijenim korijenovim sustavom (Prgomet i sur., 2013).

2.8. Mikropropagacija

Mikropropagacija je razmnožavanje određenog genotipa *in vitro* tehnikama uz očuvanje genetske stabilnosti. S obzirom da je veliki broj voćnih vrsta, pa tako i pitomi kesten *Castanea sativa* Mill. stranooplodan dolazi do gubitka uniformnosti genotipova u potomstvu. Stoga je primjena mikropropagacije i održavanje stabilnosti genotipova od visokog značaja. Nekoliko je osnovnih razloga primjene razmnožavanja *in vitro,* a to su:

(1) brža multiplikacijska stopa razmnožavanja *in vitro* u odnosu *in vivo*,
(2) mogućnost da se ustali zdravi matičnjak koji je oslobođen patogenih mikroorganizama,
(3) moguće je vegetativno razmnožavanje biljaka koje u uvjetima *in vivo* ne uspijeva,
(4) nove sorte dobivene mikropropagacijom mogu se komercijalno brzo razmnožiti i tako ponuditi tržištu u mnogo kraćem vremenu,
(5) razmnožavanje *in vitro* omogućuje zakorjenjivanje reznica pa je nepotrebno cijepljenje podloga i
(6) ekonomska računica (uštede sredstava koja se inače troše za grijanje staklenika). Osim ovoga, mikroklonirane biljke često su zdravije te snažnije i bolje rastu.

Kod mikropropagacije eksplantati biljaka uzgajaju se u uvjetima *in vitro* na umjetnim hranidbenim podlogama (medijima). Uspješnost kulture stanica, tkiva ili organa ovisit će o izboru pogodnoga sustava hranidbene podloge. Tkivo izdanka ili korijena klijanaca, aktivnih pupova ili sam vršak izdanka najbolji su biljni materijal za zametanje rahloga kalusnog tkiva. Vršni i/ili aksilarni pupovi najčešće su vrste eksplantata za započinjanje mikropropagacije (Jelaska, 1994). Sastav hranidbene podloge (medija) odlučujući je za rast. Bez obzira na različitosti hranidbenih podloga koje se danas upotrebljavaju, sve one sadrže vitamine, mineralne soli, ugljikohidrate kao izvor energije (najčešće saharozu), regulatore rasta i organske dodatke. Hranidbena podloga poznata po skraćenici MS (Murashige i Skoog, 1962) najviše je upotrebljavana podloga koja se uspješno primjenjuje za velik broj kultura. Ako u hranidbenoj podlozi ima svih ostalih potrebnih elemenata u optimalnoj količini, reakcija izrezana tkiva najviše će ovisiti o regulatorima rasta (auksinima i

citokininima). Auksini koji se najčešće upotrebljavaju za zametanje i postavljanje kalusnih kultura su indolil-3-octena kiselina (eng. *Indole-3-acetic acid*, IAA), 2,4-diklorofenoksioctena kiselina (2,4-D) i NAA. Nekim je tkivima za stvaranje kalusa u hranidbenu podlogu osim auksina, potrebno dodati i citokinin (Jelaska, 1994).

Jedan od ključnih premisa kulture *in vitro* jest da eksplantirana biljna tkiva i stanice prije unošenja na podlogu *in vitro* moraju biti sterilni. Prilikom izolacije i unošenja materijala *in vitro* također treba paziti na to da se eksplantati uzimaju samo sa zdravih, čvrstih i kvalitetnih biljaka. Prije samog početka sterilizacije potrebno je odstraniti sve zaostale komadiće zemlje, prašine ili mrtvih biljnih dijelova. Zatim se tkivo od kojega će biti uzet eksplantat uranja u 70 % alkohol (etanol) nekoliko sekundi (96 % alkohol je prejak i izaziva jaku dehidraciju tkiva) kako bi se odstranili mjehurići zraka. Nakon toga uranja se 10 – 30 min u 1 % natrijev hipoklorit (NaClO) ili kalcijev hipoklorit ($Ca(ClO)_2$), kojima je dodano nekoliko kapi detergenta, te se nakon toga pažljivo ispire sterilnom vodom, obično 3 puta po nekoliko minuta. Nakon sterilizacije tkivo se obrađuje odnosno reže na odgovarajuće dijelove, komadiće i sl. u sterilnim uvjetima upotrebom sterilnih instrumenata (Jelaska, 1994).

Metode za razmnožavanje u *in vitro* uvjetima ili mikropropagaciju su:

(1) metoda pojedinačnih nodijskih segmenata,
(2) metoda aksilarnog pupanja (grananja),
(3) metoda adventivnih izdanaka i
(4) somatska embriogeneza.

Metodom pojedinačnih nodijskih segmenata izolira se pup zajedno s komadićem pripadajuće stabljike radi poticanja razvitka izdanka. Metoda pojedinačnih nodijskih segmenata je najprirodnija metoda vegetativnog razmnožavanja biljaka *in vitro* jer se primjenjuje i *in vivo*. Karakteristika ove metode je što nije potrebno dodavanje citokinina za prekid apikalne dominacije. Zakorjenjivanje kod nekih kultura je dosta teško i traži dodavanje auksina npr. IBA, IAA ili NAA (Jelaska, 1994).

Metodom aksilarnog pupanja vegetacijski se vršak izolira i na podlozi s relativno visokom koncentracijom citokinina inducira rast aksilarnih pupova u pazušcima listova, poništavajući apikalnu dominaciju. Često se preporučuje uporaba

malih koncentracija auksina zajedno s citokininima obično u odnosu 1:10. Prednosti ove metode su što je jednostavnija od drugih, očuvana je genetička stabilnost, stopa umnožavanja je relativno visoka i rast dobivenih biljaka je vrlo dobar (Jelaska, 1994; Kereša, 2011).

Metodama somatske embriogeneze i regeneracije adventivnih organa (organonegenza) formiraju se meristemi *de novo*. Somatska embriogeneza (SE) je proces u kojem diploidne ili haploidne somatske stanice prolaze kroz karakteristične embrijske stadije bez fuzije gameta i mogu stvarati kompletne biljke. Razmnožavanje biljke stvaranjem adventivnih organa ovisi o sposobnosti regeneracije i ravnoteži citokinina i auksina u hranidbenoj podlozi. BA (6-benzilaminopurin) je najdjelotvorniji citokinin za rast adventivnih pupova (Kereša, 2011).

2.8.1. Regulatori rasta citokinini

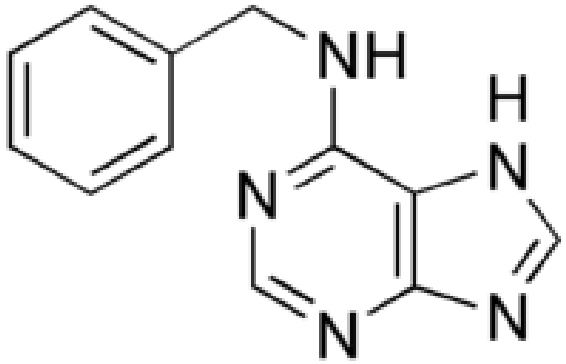
Citokinini su derivati adenina koji sadrže izoprenoidni lanac i imaju važnu ulogu u rastu i razvoju biljaka. Prvi prirodni citokinin izoliran iz biljke bio je zeatin. Zeatin (ZEA) je dobio ime po rodu kukuruza *Zea* jer je u njemu otkriven. Osim ZEA, fitohormoni koji pripadaju skupini citokinina su 6-benzilaminopurin (BAP), kinetin (KIN), tidiazuron (TDZ) i 2-izopentenil adenin (2iP) (Kakimoto, 2013). BAP je prvi sintetski citokinin (Slika 13.). U radu s kulturom biljnog tkiva ovi se hormoni upotrebljavaju za poticanje stanične diobe i stvaranje izdanaka. Citokinini potiču diobu stanica ukoliko su u mediju zajedno s auksinima i induciraju razvoj adventivnih izdanaka. Visoka koncentracija citokinina poništava apikalnu dominaciju i inducira razvitak aksilarnih izdanaka. Pokazalo se da citokinini usporavaju starenje biljnih organa sprječavanjem razgradnje proteina, aktivacijom sinteze proteina i akumulacijom hranjivih tvari iz obližnjih tkiva (Jelaska, 1994). Biosinteza citokinina odvija se kroz tri različite reakcije:

(1) Biosinteza započinje uz adenozin-fosfat-izopentiltransferazu (AtIPT) koja djeluje kao katalizator i koristi energiju u obliku ATP, ADP ili AMP. Hidroksimetilbutenil pirofosfat je donor prenilih baza.

(2) Citokinini mogu nastati iz reakcije degradacije tRNA iz biljaka i bakterija. To se događa s tRNA molakulama koje prepoznaju kodon

UNN na čijoj se 3' strani odmah uz antikodon nalazi adenozin. Prilikom procesa degradacije takva tRNA oslobađa adenozin u obliku citokinina. Ovu reakciju katalizira tRNA - izopentiltransferaza.

(3) Alternativni put biosinteze citokinina temelji se na dodavanju hidroksiliranog bočnog lanca na adenozin (Kakimoto, 2013).



Slika 13. 6-benzilaminopurin (BAP)

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/6-Benzylaminopurine

2.8.2. Mikropropagacija pitomog kestena

Pitomi kesten je devastirana vrsta zbog raka kestenove kore i truleži korijena, a posljednjih godina i novih štetočina. Sadnja novih stabala otpornijih genotipova bila bi važan pothvat. Nove sadnice moguće je proizvesti generativno, ali zbog stranooplodnje, sadni materijal u tom slučaju nije uniforman, te potomstvo u potpunosti ne nasljeđuje sva željena svojstva roditeljskih sorata. Do sada su provedena mnogobrojna znanstvena istraživanja fokusirana na vegetativno razmnožavanje kako bi se zadovoljila potražnja za elitnim genotipovima sa svojstvom otpornosti na bolesti, visokokvalitetnog drva i ploda (Vieitez i sur., 2007). Vegetativno razmnožavanje pitomog kestena prilično je teško postići. Visoke razine fenolnih spojeva, nedostatak reaktivnosti tkiva i teško postizanje ukorjenjivanja su primarni

problemi koji se trebaju riješiti kako bi se uspješno postigla veća komercijalna proizvodnja traženih sorata (Chauvin i Salesse, 1988). Cijepljenje je najčešća konvencionalna metoda razmnožavanja. Metode cijepljenja euro-japanskih hibrida otpornih na bolesti su široko korištene u rasadnicima (Vieitez i sur., 2007). Međutim nekoliko je problema povezano s tom metodom. Rana napravljena tijekom postupka može poslužiti kao ulazna točka za nekoliko patogena, poput raka kestenove kore, te se javlja i problem nekompatibilnosti podloge i plemke (Osterc i sur., 2005). Stoga se mikropropagacija kao metoda vegetativnog razmnožavanja nameće kao rješenje problematike konvencionalnih metoda razmnožavanja.

Prema Vieitez i sur. (2007) mikropropagacija pitomog kestena temelji se na dvije metode, somatskoj embriogenezi i aksilarnom pupanju (grananje). Nekoliko znanstvenih istraživanja prikazalo je potencijal somatske embriogeneze pitomog kestena, ne samo za mikropropagaciju, već i za programe genetičkog inženjerstva (Corredoira i sur., 2006). Iako je somatska embriogeneza u odnosu na aksilarno grananje teoretski učinkovitija za klonsko razmnožavanje, potrebno je prevladati nekoliko poteškoća kako bi se postigla komercijalna održivost, posebice kada kultura potječe iz odraslih tkiva. Pitomi kesten se može mikropropagirati iz mladog i zrelog biljnog materijala koristeći metodu aksilarnog pupanja. Razmnožavanje pitomog kestena mikropropagacijom i dalje je u mnogim slučajevima izazovni pothvat, jer je uobičajeno da protokoli zahtijevaju optimizaciju za određeni kultivar. Danas se uglavnom koristi u istraživačke svrhe ili za dobivanje baznog materijala oslobođenog bolesti i virusa. Međutim ipak postoji nekoliko europskih tvrtki koje proizvode tisuće biljaka godišnje (Vieitez i sur., 2007).

U posljednjih nekoliko godina provedena su mnogobrojna istraživanja kako bi se utvrdila najprikladnija hranidbena podloga za rast kulture pitomog kestena. Većina istraživanja mikropropagacije provođena su na hranidbenim podlogama GD (Gresshoff i Doy, 1972) i modificiranom MS (Murashige i Skoog, 1962) mediju. Primjenom ovih medija izbjegnuta je apikalna nekroza i kloroza tkiva, te biljčice generalno bolje izgledaju (Sánchez i sur., 1997; Vietiez i sur., 2007). Međutim, u protokolima mikropropagacije američkog pitomog kestena *Castanea dentata* (Marsh.) Borkh pojedinačni izdanci ili nakupine izdanaka postavljeni su na medij WMP (eng. *Woody Plant Medium*, Lloyd i McCown, 1981) s dodatkom 1 mg/L BAP za inicijaciju kulture i 0,2 mg/L BAP za proliferaciju. Nakon 4 – 8 tjedana izdanci su vertikalno izrezani u baznom dijelu do otprilike 2 mm, umočeni u 5 ili 10 mM IBA, 1 minutu i

supkultivirani na polovičnu koncentraciju medija MS s 0,2 g/L aktivnog ugljena na 2 tjedna. Zabilježena je indukcija rasta korijena koji postaju vidljivi. Izdanci su ponovno preseljeni na početni medij WMP čime se omogućava rast korijena i izdanaka. Upotrebom ovog protokola dokazana je uspješnost indukcije razvoja korijena na 57 – 73 % biljaka s manje od 23 % nekroze vegetacijskih vršaka (Xing i sur., 1997).

Vieitez i sur. (2007) na temelju usporedbe dobivenih rezultata istraživanja sa saharozom, glukozom i fruktozom kao izvorom ugljika u hranidbenoj podlozi, navode 3 % saharozu najboljim izvorom. Primjena 3 – 4 % fruktoze ili glukoze kao izvora ugljika omogućuje najveći broj izdanaka po eksplantatu, međutim izdanci pokazuju visoku stopu hiperhidracije i slab rast. Izvrsna alternativa 3 % saharoze je 2 % glukoze. Predumnažanje biljnog materijala vrši se supkultivacijom u intervalima od 4 – 5 tjedana. *In vitro* stabilizacija se postiže unutar 4 – 8 ciklusa supkultura, a kulture se mogu održavati godinama ako se koriste zdravi i snažni izdanci. Ukoliko izdanci nisu očekivano izduženi nakon 3 – 4 tjedna kulture, potrebno je supkultivirati (na 2 – 3 tjedna) na hranidbenu podlogu sa smanjenom koncentracijom BAP (0,05 mg/L) kako bi se potaknulo izduživanje i jači rast. Dodavanje askorbinske kiseline (vitamin C) u hranidbenu podlogu i izbor optimalnog eksplantata djelomično rješava problem fenola. Na mikropropagaciju utječu genotip i vrsta eksplantata. Genotip je jedna od najvažnijih odrednica svih relevantnih parametara, poput broj izdanaka, duljine izdanaka i ukupne efikasnosti umnožavanja. Veći broj izdanaka dao je nodalni segment s 2 – 3 aksilarna izdanka u odnosu na vegetacijski vršak (Chauvin i Salesse, 1988; Vieitez i sur., 2007).

Sánchez i sur. (1996) proveli su istraživanje kako bi utvrdili najbolji tip eksplantata za mikropropagaciju pitomog kestena i determinirali optimalan tretman induciranja rasta korijena. Najbolja vrsta eksplantata je nodalni segment, posebice s tkivom kalusa na bazalnom segmentu. Iako je postotak ukorjenjivanja znatno povećan kada je kombinirano 7 dana 3 mg/L IBA tretmana s 5 dana tretmana mrakom, javlja se teška nekroza vegetacijskih vršaka. Primjenom 24 satnog tretmana bez mraka s 25 – 50 mg/L IBA i 1 % aktivnog ugljena u proliferacijskom mediju za ukorjenjivanje postignuti su najbolji rezultati. Kod svih klonova aktivni ugljik poboljšao je razvoj lateralnog korijena, smanjio je simptome nekroze vegetacijskih vršaka i potaknuo ponovnu inicijaciju rasta izdanaka. Postotak ukorjenjivanja postignut u tresetnoj i perlitnoj podlozi bio je sličan.

Gonçalves i sur. (1988) su za indukciju korijena, bazni dio izdanaka močili 1 min u 1 g/L IBA otopine ili kultivirali 5 dana u agarnom mediju s 3 mg/L IBA. Za razvoj korijena, inducirani izdanci prenose se ili u medij bez auksina ili na perlitni supstrat. Postotak ukorjenjivanja je veći kada je razvoj korijena izveden *in vitro* (97 %) nego *ex vitro* (77 %). Uspješnost aklimatizacije je 100 % kod biljaka s *ex vitro* razvijenim korijenima, a kod biljaka s *in vitro* razvijenim korijenima iznosi 50 %.

Prema istraživanju Mullins (1987) eksplantati nodalnih segmenata iz dvogodišnje sadnice i odrasle biljke imaju 100% uspješnost u razvijaju izdanaka unutar jednog mjeseca na 1/2 MS + BAP (0,1 mg/L). Na MS - ½ NO3 + BAP (0,1 mg/L) izdanci se nadalje množe brzinom od 2 – 3 puta / 3 tjedna. Iako se sadnica može ukorijeniti *in vitro*, veća je uspješnost ukorjenjivanja *in vivo* uranjanjem izdanaka u Seradix 3 (0,8 % IBA) ili IBA (1 mg/L) i sadnja u plavac (plovučac), u magli (2 s/20 min), s ugrijanim dnom od 25 °C. Ukorjenjivanje eksplantata biljnog materijala odrasle biljke nije uspješno.

Cuenca i sur. (2017) razvili su protokol za kultiviranje aksilarnih izdanka koji su kontinuirano baznim dijelom uronjeni u tekući medij. Uspješno je kultivirano 8 različitih genotipa u 10 L bioreaktorima u polovičnoj koncentraciji tekućeg medija MS s 0,05 mg/L BAP i 30 g /L saharoze. Prisilna ventilacija je neophodna za proizvodnju zdravih, ne-hiperhidriranih izdanaka. Postignute su visoke stope proliferacije i kvalitetni izdanci spremni za umnožavanje, zakorjenjivanje i aklimatizaciju. Uočeno je veće lišće s višim koncentracijama fotosintetskih pigmenata što upućuje na određeni stupanj fotoautotrofije u izdancima uzgojenim pod prisilnom ventilacijom u bioreaktorima. Ovo je prva demonstracija proizvodnje kestenovih izdanaka u stacionarnom tekućem mediju, što ukazuje na izvedivost metode za razmnožavanje velikih razmjera. Troch i sur. (2010) također navode potencijal upotrebe bioreaktora kao učinkovitog i ekonomičnog sredstva za masovno klonsko razmnožavanje pitomog kestena. Dokazano je da su eksplantati vegetacijskih vršaka kvalitativno bolji te imaju duže izdanke i veći broj listova.

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal i sterilizacija

Istraživanje je provedeno na biljnom materijalu pitomog kestena prikupljenom početkom vegetacije sa samoniklog stabla u okolici Petrinje. Segmenti mladih izdanaka iz korijena sterilizirani su najprije u 70 % etanolu 4 minute. Zatim su stavljeni u 5 % otopinu Izosan G (100 % natrijev dikloroizocijanurat dihidrat, Pliva, Hrvatska) sa dodatkom ovlaživaća polioksietilen sorbitan monolaurata (Tween-20) u trajanju od 15 minuta. Biljni materijal je potom ispiran 4 puta po 5 minuta u destiliranoj sterilnoj vodi kojoj je bila dodana askorbinska kiselina 150 mg/L koncentracije.

3.2. Sterilizacija pribora

Od laboratorijskog pribora korištene su pincete, skalpeli, stakleno posuđe (petrijeve zdjelice) i Magenta posudice (Magenta™ vessel GA-7, Sigma-Aldrich, Njemačka). Sterilizacija se odvijala u autoklavu na programu od 25 minuta, temperaturi od 121 °C i tlaku od 1 bara, nakon čega je korišten suhi sterilizator za sušenje. Skalpeli i pincete su učestalo sterilizirani na plameniku tijekom rada u sterilnim uvjetima laminara.

3.3. Sastav hranidbene podloge

Hranidbena podloga (medij) korištena za uspostavljanje kulture biljnog tkiva i mikropropagaciju pitomog kestena je MS (Murashige i Skoog, 1962) koja se sastoji od makro i mikroelemenata, MS vitamina, 0,1 g/L mio-inozitola, 30 g/L saharoze, Bacto-agara 8 g/L ili Plant-agara 7 g/L, pH vrijednosti 5,8. U Tablici 5. prikazan je sastav hranidbenih podloga ovisno o tretmanu bez ili s dodatkom giberelinske kiseline (eng. *Gibberellic acid*, GA3), vrsti agara (Bacto ili Plant) i različitih citokinina i njihovih koncentracija.

Tablica 5. Sastav hranidbenih podloga za mikropropagaciju pitomog kestena *Castanea sativa* Mill.

Hranidbena podloga	Sastav hranidbene podloge
MS HFM	MS (Murashige i Skoog, 1962) makro- i mikroelementi, MS vitamini, 0,1 g/L mio-inozitola, 30 g/L saharoze, Bacto-agar 8 g/L ili Plant-agar 7 g/L, pH 5,8
MS BAP 1,5 BA	MS HFM 8 g/L Bacto agar + 1,5 mg/L BAP
MS BAP 1,5 PA	MS HFM 7 g/L Plant agar + 1,5 mg/L BAP
MS BAP 1,5 GA3 0,2 BA	MS HFM 8 g/L Bacto agar + 1,5 mg/L BAP + 0,2 mg/L GA3
MS BAP 1,5 GA3 0,2 PA	MS HFM 7 g/L Plant agar + 1,5 mg/L BAP + 0,2 mg/L GA3
MS ZEA 1,5 BA	MS HFM 8 g/L Bacto agar + 1,5 mg/L ZEA
MS ZEA 1,5 PA	MS HFM 7 g/L Plant agar + 1,5 mg/L ZEA
MS ZEA 1,5 GA3 0,2 BA	MS HFM 8 g/L Bacto agar + 1,5 mg/L ZEA + 0,2 mg/L GA3
MS ZEA 1,5 GA3 0,2 PA	MS HFM 7 g/L Plant agar + 1,5 mg/L ZEA + 0,2 mg/L GA3

BA - bacto agar; BAP - 6-benzilaminopurin; GA3 - giberelinska kiselina; PA - plant agar; ZEA - zeatin

Nakon određivanja i uspostavljanja pH medija na 5,8 vrijednosti, dodano je ovisno o tretmanu, 8 g/L Bacto agara ili 7 g/L Plant agara. Mediji su potom sterilizirani u autoklavu na programu od 25 minuta, temperaturi od 121 °C i tlaku od 1 bara, te izlijevani u sterilizirane epruvete ili sterilizirane Magenta posudice u sterilnim uvjetima laminara.

3.4. Postavljanje u kulturu *in vitro* i mikropropagacija

Kao početni biljni materijal izolirani su vegetacijski vršci veličine 1 – 2 mm iz aksilarnih pupova korijenovih izdanaka pomoću stereomikroskopa. Vegetacijski vršci postavljeni su u epruvete od 100 mL i nakon dva ili tri dana supkultivirani jer su posmeđili zbog štetnog utjecaja izlučivanja fenola. Supkultivirani su na uspostavni medij MS + 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L IBA. Postavljanje biljnog materijala odvijalo se u sterilnim uvjetima laminara. Nakon početnog razmnožavanja do dovoljne količine biljnog materijala za postavljanje pokusa (Slike 14.), novi izdanci dobiveni *in vitro* iz primarnih eksplantata su izrezani i uvedeni u medij kao kratki izdanci (mikroizdanci, 0,5 – 1 cm) ili nodalni segmenti (jedno- ili dvonodalni) (Slika 15.). Kratki izdanci su uvijek postavljani u medij u Magenta posudicama okomito, a nodalni segmenti okomito ili polegnuti. Postavljeno je pet ili devet eksplantata ovisno o supkultivaciji. S nodalnih segmenata u potpunosti su odrezani listovi i peteljke, pritom pazeći da se ne oštete pupovi. Broj nodalnih segmenata i mikroizdanaka je podjednako raspoređen u svakom ciklusu supkultivacije.



Slika 14. Početno razmnožen biljni materijal za daljnju pripremu eksplantata

Foto: S. Kereša

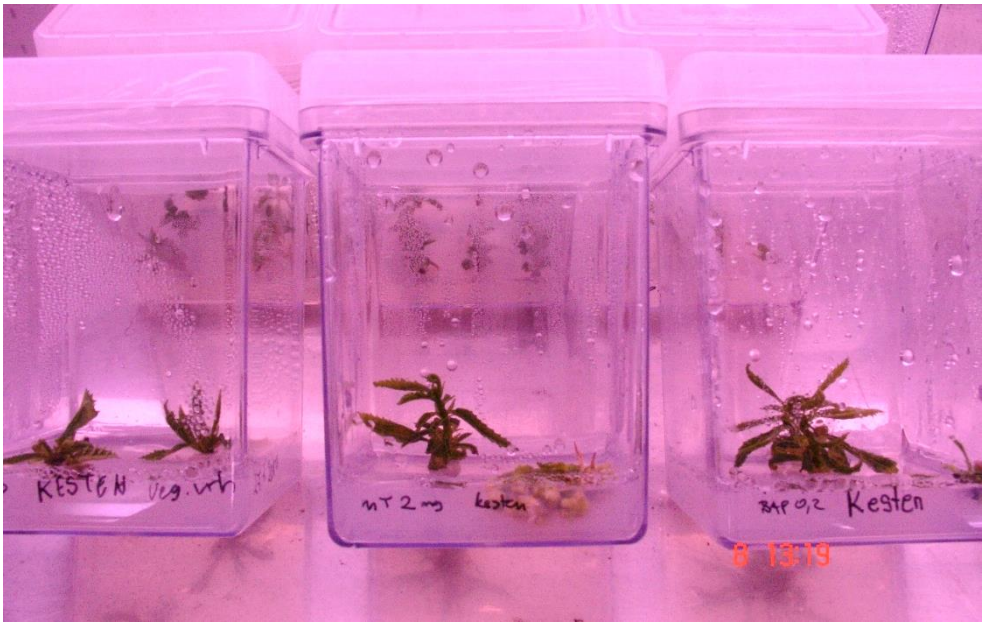


Slika 15. Priprema eksplantata za postavljanje pokusa

Foto: S. Kereša

U svrhu istraživanja provedeno je pet supkultivacija u ciklusima od pet do šest tjedana. Kultivacija se odvijala u komori rasta na 22 °C, fotoperiodu 16 sati dan/ 8 sati noć i intenzitetu svjetla od 40 μE m^{-2} s^{-1} (Slika 16.).

Tijekom svih pet supkultivacija ispitivana je učinkovitost proliferacije izdanaka s obzirom na vrstu postavljenih eksplantata (kratki izdanci (mikroizdanci) ili nodalni segmenti), vrstu citokinina (BAP ili ZEA) te njihovu interakciju. Eksplantati su bili postavljeni na medij u kojem je korišten ili samo BAP ili ZEA. BAP i ZEA su tijekom cijelog istraživanja bili u koncentraciji 1,5 mg/L. Koncentracija GA3 u hranidbenoj podlozi tijekom prve dvije supkultivacije bila je 0,2 mg/L. U trećoj supkultivaciji postavljen je dodatni pokus kako bi se ispitao utjecaj vrste agara u hranidbenoj podlozi na mikropropagaciju. Umjesto Bacto agara (8 g/L) uveden je Plant agar smanjene koncentracije (7 g/L), te je sastav MS medija ostao isti, s istom koncentracijom GA3 (0,2 mg/L), BAP-a (1,5 mg/L) ili ZEA (1,5 mg/L). U četvrtoj i petoj supkultivaciji mikroizdanci i nodalni segmenti su postavljeni na dva medija MS bez GA3 u odnosu na prethodne supkultivacije.



Slika 16. Kultivacija eksplantata pitomog kestena u komori rasta

Foto: S. Kereša

3.5. Statistička analiza podataka

Istraživanje je provedeno u biotehnološkom laboratoriju Agronomskog fakulteta u Zagrebu, Zavoda za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku. Pokus je postavljen prema potpuno slučajnom rasporedu. Bilježena svojstva u pokusu mikropropagacije pitomog kestena bila su: broj eksplantata, broj izdanaka po eksplantatu, dužina najdužeg izdanka (mm) i dužina ostalih izdanaka (mm).Mjereni su svi izdanci po eksplantatu iz čega je kao izvedena varijabla izračunata i prosječna dužina izdanaka (mm).

Za analizu utjecaja vrsta eksplantata (nodalni segment ili kratki izdanci) i različitih vrsta citokinina (BAP i ZEA) na broj izdanaka, dužinu najdužeg izdanka (mm), prosječnu dužinu izdanaka (mm), provedena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA). Za analizu utjecaja koncentracije giberelinske kiseline (0 mg/L i 0,2 mg/L) u hranidbenoj podlozi provedena je jednosmjerna analiza varijance. Za utjecaj različitih vrsta agara (Bacto agar i Plant agar) u hranidbenoj podlozi korištena je također jednosmjerna analiza varijance. Srednje vrijednosti dobivenih rezultata provedenih analiza su uspoređene Duncan-ovim testom ili LSD testom na razini signifikantnosti $P \leq 0,01$.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Uspostavljanje kulture biljnog tkiva

Na medij za uspostavljanje kulture biljnog tkiva, postavljeni su vegetacijski vršci, veličine 1 – 2 mm, koji su izolirani iz aksilarnih pupova izdanaka korijena pomoću stereomikroskopa. Vegetacijski vršci su postavljeni u epruvete od 100 mL i nakon 2 ili 3 dana supkultivirani zbog izlučivanja fenola iz biljnog tkiva, što je rezultiralo smeđenjem. Supkultivirani su na uspostavni medij MS s dodatkom 1 mg/L BAP i 0,1 mg/L IBA. Od ukupno 18 postavljenih eksplantata, pet je bilo kontaminirano, a šest nekrotiziranih. Samo sedam eksplantata bilo je živo nakon jedan mjesec kultiviranja. Preostali eksplantati supkultivirani su nekoliko puta do proliferacije dovoljnog broja izdanaka za postavljanje pokusa na tretmanima.

Chauvin i Salesse (1988) navode da dodavanje askorbinske kiseline (vitamin C) u hranidbenu podlogu i izbor optimalnog eksplantata djelomično rješava problem fenola. U protokolu mikropropagacije američkog pitomog kestena i inicijaciji kulture, Xing i sur. (1997) navode da su postignuti najbolji rezultati postavljanjem pojedinačnih izdanaka ili nakupine izdanaka na WMP s dodatkom 1 mg/L BAP. Prema Vieitez i sur. (2007), ukoliko izdanci nisu očekivano izduženi nakon inicijacije kulture, potrebno je supkultivirati (na 2 – 3 tjedna) na hranidbenu podlogu sa smanjenom koncentracijom BAP-a (0,05 mg/L) kako bi se potaknulo izduživanje i jači rast.

Nakon početnog razmnožavanja do dovoljne količine biljnog materijala za postavljanje pokusa, novi izdanci dobiveni *in vitro* iz primarnih eksplantata su izrezani i podijeljeni u kratke izdanke 0,5 – 1 cm ili nodalne segmente. Eksplantati su postavljeni u Magenta posudice (Magenta™ vessel GA-7) i zatvoreni Parafilmom.

4.2. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o vrsti eksplantata

Postavljeno je 3, 5 ili 9 eksplantata po Magenta posudici ovisno o supkultivaciji. Nodalni segmenti postavljeni su okomito ili vodoravno u medij MS. Mikroizdanci su postavljeni okomito u medij.

Analizom varijance (Tablica 6.) utvrđena je signifikantna razlika u broju izdanaka, dužini najdužeg izdanka (mm) i prosječnoj dužini izdanaka (mm), obzirom na vrstu eksplantata. Nodalni segmenti dali su signifikantno veći broj izdanaka u odnosu na mikroizdanke. Međutim, dužina najdužeg izdanka (mm) i prosječna dužina izdanaka (mm) bila je signifikantno veća kod izdanaka razvijenih iz mikroizdanaka kao vrste eksplantata u odnosu na nodalne segmente.

Tablica 6. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o vrsti eksplantata

Vrsta eksplantata	Ukupan broj izdanaka	Dužina najdužeg izdanka (mm)	Prosječna dužina izdanaka (mm)
Kratki izdanci (mikroizdanci)	1,3 B	9,3 A	8,6 A
Nodalni segmenti	2,3 A	7,1 B	5,3 B

*vrijednosti označene istim slovom unutar stupca ne razlikuju se signifikantno



Slika 17. Izdanci razvijeni na nodalnom segmentu nakon 30 dana supkultivacije

Foto: I. Cvitković



Slika 18. Izdužen kultivirani mikroizdanak nakon 30 dana supkultivacije

Foto: I. Cvitković

Na Slikama 17. i 18. može se vidjeti razlika u broju izdanaka i dužini najduljeg izdanka. Na nodalnom segmentu razvila su se tri izdanka. Međutim, u odnosu na supkultiviran mikroizdanak imaju manju dužinu izdanaka. Na mikroizdanku nije bilo proliferacije odnosno nema razvijenih dodatnih izdanaka, već se je supkultivirani mikroizdanak samo izdužio. To upućuje na zaključak o jakoj apikalnoj dominaciji vegetacijskog vrška koju citokinini nisu uspjeli poništiti.

U istraživanju Chauvin i Salesse (1988) također je zabilježen veći broj izdanaka kod nodalnih segmenta u odnosu na vegetacijske vrške. Iz nodalnih segmenata proliferirali su u prosjeku 2 – 3 aksilarna izdanka. Sánchez i sur. (1996) proveli su istraživanje kako bi ustvrdili najbolji tip eksplantata za mikropropagaciju pitomog kestena. Ustanovljeno je da je najbolja vrsta eksplantata nodalni segment, posebice s tkivom kalusa na bazalnom segmentu. Rezultati navedenih istraživanja su u skladu s ovim istraživanjem i upućuju na to da nodalni segmenti imaju pozitivan učinak na ukupan broj izdanaka i mogu se preporučiti u tu svrhu.

4.3. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o različitim citokininima

Za analizu utjecaja različitih citokinina na broj izdanaka, dužinu najdužeg izdanka (mm) i prosječnu dužinu izdanaka (mm), provedena je ANOVA. U Tablici 7. prikazani su rezultati prosječnih vrijednosti analiziranih svojstava. Koncentracije citokinina bile su 1,5 mg/L.

Tablica 7. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o vrsti citokinina

Citokinin	Ukupan broj izdanaka	Dužina najdužeg izdanka (mm)	Prosječna dužina izdanaka (mm)
BAP	1,7 A	9,2 A	8,1 A
ZEA	1,2 B	7,2 B	6,4 B

*vrijednosti označene istim slovom unutar stupca ne razlikuju se signifikantno

Na temelju dobivenih rezultata analize varijance utvrđena je značajna razlika u mjerenim svojstvima primjenom BAP ili ZEA u hranidbenoj podlozi za mikropropagaciju. Prikupljeni podaci ukupnog broja izdanaka, dužini najdužeg izdanka (mm) i prosječnoj dužini izdanaka (mm) na BAP (1,5 mg/L), signifikantno se razlikuju u odnosu na ZEA (1,5 mg/L), te u sva tri slučaja opažene vrijednosti s primjenom BAP imaju veću vrijednost od ZEA (Slika 12.).

Vieitez i Vieitez (1980) navode da BAP pokazuje najprikladniji učinak na proliferaciju aksilarnih izdanaka, dok ZEA blago inhibira razvoj aksilarnih izdanaka, ali povećava brzinu indukcije i stvara snažnije izdanke. I u ovom istraživanju može se uočiti da su listovi na izdancima kultiviranim na ZEA veći (robusniji) od listova izdanaka kultiviranih na BAP.

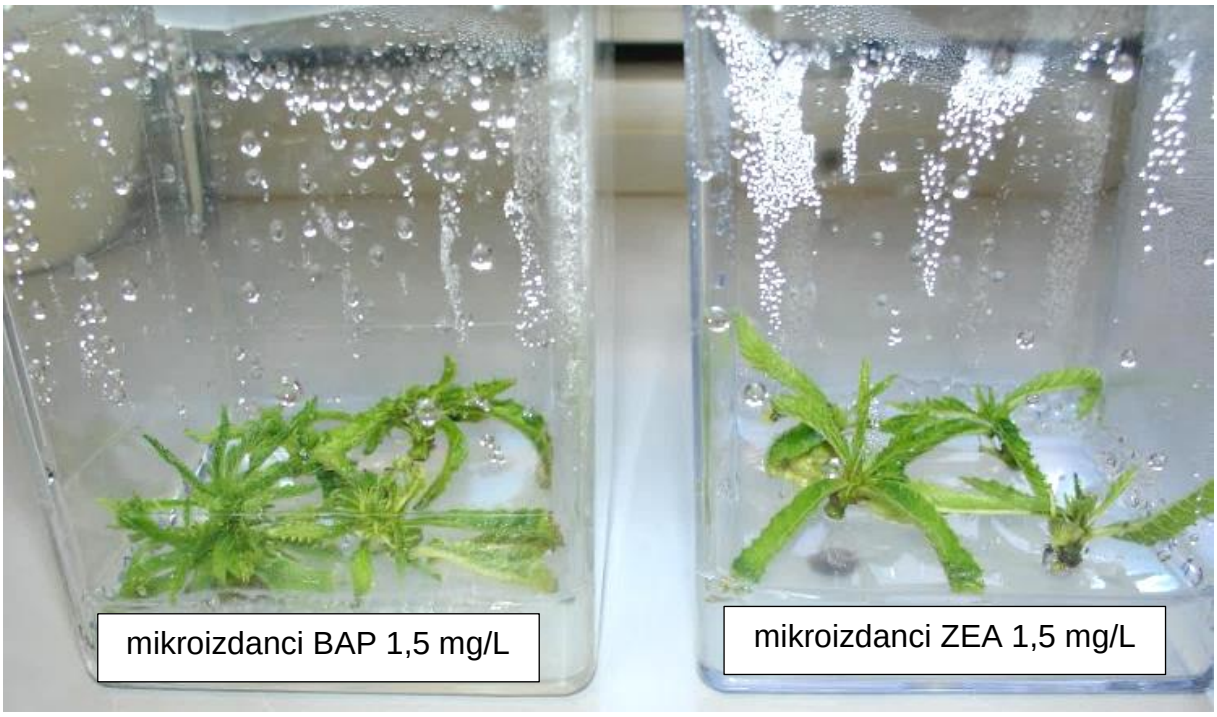
4.4. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o interakciji citokinina i vrste eksplantata

Provedena dvofaktorijelna ANOVA u kojoj je prvi faktor bila vrsta eksplantata, odnosno nodalni segment ili mikroizdanak, a drugi faktor vrsta citokinina, BAP ili ZEA, pokazala je da interakcije vrste citokinina i vrste eksplantata visoko signifikantno utječu na ukupan broj izdanaka, dužinu najdužeg izdanka (mm) i prosječnu dužinu izdanka (Slika 19.). BAP i ZEA u hranidbenoj podlozi bili su koncentracije 1,5 mg/L. U Tablici 8. prikazane su prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o interakciji eksplantata i citokinina. Srednje vrijednosti svojstava proizašlih kao rezultat interakcije vrste eksplantata i vrste citokinina uspoređene su Duncan-ovim testom.

Tablica 8. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o vrsti eksplantata i citokinina

Eksplantat-citokinin	Ukupan broj izdanaka	Dužina najdužeg izdanka (mm)	Prosječna dužina izdanaka (mm)
Nodalni segment-BAP	2,7 A	8,3 A	6,1 B
Mikroizdanak-BAP	1,3 B	9,5 A	8,9 A
Nodalni segment-ZEA	1,2 B	3,9 B	3,2 C
Mikroizdanak-ZEA	1,2 B	8,7 A	7,8 AB

*vrijednosti označene istim slovom unutar stupca ne razlikuju se signifikantno



Slika 19. Mikroizdanci postavljeni na MS BAP (1,5 mg/L) i mikroizdanci postavljeni na MS ZEA (1,5 mg/L)

Foto: S Kereša

Ukupan broj izdanaka bio je signifikantno veći na nodalnim segmentima postavljenim na mediju MS s 1,5 mg/L BAP, u odnosu na mikroizdanke postavljene na BAP, nodalne segmente i mikroizdanke postavljene na zeatinu. Najniži ukupni broj izdanaka 1,2 je proliferirao na mikroizdancima postavljenim na zeatinu. Najpovoljniji tretman za proliferaciju većeg broja izdanka je iz nodalnih segmenata postavljenih na 1,5 mg/L BAP kod kojeg je prosječan ukupan broj izdanaka bio 2,7 po postavljenom eksplantatu (Slika 20).

Mullins (1987) je dobio veoma slične rezultate istraživanja. Dokazao je da eksplantati nodalnih segmenata uzetih s dvogodišnje sadnice i odrasle biljke imaju veću uspješnost u razvijanju izdanaka unutar jednog mjeseca na 1/2 koncentraciji medija MS s BAP. Međutim korištena je smanjena koncentracija BAP od 0.1 mg/L. Prema istraživanju Osterc i sur. (2005) signifikantno veći broj izdanaka (2,1) također je ostvaren na mediju s BAP (1 mg/L), u odnosu na ZEA (1 mg/L) (1,2). U našem istraživanju je prosječna vrijednost ukupnog broja izdanaka na ZEA iznosila 1,2 izdanka po eksplantatu.



Slika 20. Izdanci nodalnih seg. s MS BAP (1,5 mg/L)

Foto: S. Kereša

Dužina najdužeg izdanka analizirana kod interakcije eksplantata i citokinina ima visoko signifikantnu razliku. Na temelju dobivenih rezultata (Tablica 8.) utvrđeno je da nodalni segmenti na BAP, mikroizdanci na BAP i mikroizdanci na zeatinu imaju signifikantno veću dužinu najdužeg izdanka u odnosu na nodalne segmente na zeatinu. Nodalni segmenti i mikroizdanci na BAP i mikroizdanci na zeatinu međusobno se ne razlikuju signifikantno u dužini najdužeg izdanka. Najveća zabilježena vrijednost je 9,5 mm ostvarena na mikroizdanku postavljenom na BAP. Tetsumura i Yamashita (2004) proveli su istraživanje na japanskom kestenu (*Castanea crenata* Sieb et Zucc.) koristeći nodalne segmente i 3 vrste citokinina. Nodalni segmenti su postavljeni na ZEA, BAP i TDZ. Bilježeni podaci su dužina izdanaka i izdanci s hiperhidracijom. Dobiveni su bolji rezultati primjenom 5 μM ZEA u odnosu na 5 μM BAP i TDZ. Dužina najdužeg izdanka postignuta je na 6,9 μM ZEA. Međutim primjena većih koncentracija ZEA u mediju, rezultira većim brojem izdanaka s hiperhidracijom.

Prosječna dužina izdanaka analizirana kod interakcije eksplantata i citokinina ima visoko signifikantnu razliku. Na temelju dobivenih rezultata (tablica 8.) utvrđeno je da se mikroizdanci na BAP signifikantno razlikuju od nodalnih segmenata na BAP i nodalnih segmenata na ZEA, s ostvarenom najvećom prosječnom dužinom izdanaka

od 8,8 mm. Mikroizdanci na zeatinu imaju signifikantno veću prosječnu dužinu izdanaka 7,8 mm od nodalnih segmenata na zeatinu, te se ne razlikuju signifikantno od mikroizdanaka i nodalnih segmenata na BAP. Nodalni segmenti na ZEA imaju signifikantno najmanju prosječnu dužinu izdanaka (3,2 mm), u odnosu na ostale interakcije. Uz 99 % sigurnost najpovoljniji tretman za najveću prosječnu dužinu izdanaka je postavljanje mikroizdanaka na 1,5 mg/L BAP.

Prema istraživanju Osterc i sur. (2005) kultiviranje na mediju MS s BAP (1 mg/L) također rezultira najjačim rastom novo formiranih izdanaka, s više od 12 mm u prosjeku, a prosječna dužina izdanaka na ZEA (1 mg/L) je iznosila 10 mm. Razlike nisu značajne.

Međutim, općenito su se izdanci s bilo koje vrste eksplantata i citokinina rijetko kad baš lijepo izdužili kao u primjeru na Slici 21. Kako je vidljivo iz prijašnjih slika (Slike 17, 18, 20) tamo gdje se je i dogodilo izduživanje izdanaka, još uvijek su vidljivi zbijeni nodiji i uslijed tog zadebljale stabljike.



Slika 21. Lijepo izduženi izdanci nodalnog segmenta na MS BAP (1,5 mg/L)

Foto: S. Kereša

4.5. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o vrsti agara

Proveden je pokus kako bi se utvrdile eventualne razlike u broju izdanaka, dužine najdužeg izdanka (mm) i prosječne dužine izdanaka (mm) u ovisnosti o vrsti agara u mediju. Analizirani su prikupljeni podaci navedenih svojstava s medija MS s Bacto agarom (8 g/L) i medija MS s Plant agarom (7 g/L). Mediji MS sadržavali su 1,5 mg/L BAP ili 1,5 mg/L ZEA (ovisno o tretmanu) i GA3 (0 mg/L ili 0,2 mg/L ovisno o tretmanu). Prilikom provedbe analize prikupljenih podataka korištene su statističke metode jednosmjerne analize varijance. U Tablici 9. prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 9. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o vrsti agara u hranidbenoj podlozi

Vrsta agara	Ukupan broj izdanaka	Dužina najdužeg izdanka (mm)	Prosječna dužina izdanaka (mm)
Bacto agar	1,8 A	9,5 A	8,0 A
Plant agar	2,0 A	9,4 A	8,0 A

*vrijednosti označene istim slovom unutar stupca ne razlikuju se signifikantno

Na temelju dobivenih rezultata nije utvrđena signifikantna razlika zavisnih varijabli, odnosno broja izdanaka, dužine najduljeg izdanka (mm) i prosječne dužine izdanaka (mm) na mediju MS s 8 g/L Bacto agara i mediju MS sa 7 g/L Plant agara. Najveća razlika je u ukupnom broju izdanaka, no i tu je razlika manja od 0,2 mm i nije signifikantna (Tablica 8). Dužina najdužeg izdanka se razlikuje za 0,1, dok je prosječna dužina izdanaka skoro potpuno jednaka. Iz svega navedenog možemo zaključiti kako vrsta agara nema utjecaja na mikropropagaciju, tj. da različite vrste agara imaju jednak utjecaj. Za pitomi kesten nema do sad objavljenog istraživanja koje uspoređuje uspješnost mikropropagacije na Bacto agaru u odnosu na Plant agar.

4.6. Učinkovitost mikropropagacije u ovisnosti o giberelinskoj kiselini

Prilikom provedbe analize prikupljenih podataka korištene su statističke metode jednosmjerne analize varijance i srednje vrijednosti uspoređene su LSD – testom. Analizirani su podaci mjereni s eksplantanata s dva medija MS. U prvom mediju MS koncentracija GA3 je 0 mg/L, a u drugom 0,2 mg/L (tablica 10.).

Tablica 10. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o koncentraciji giberelinske kiseline

Koncentracija GA3 (mg/L)	Ukupan broj izdanaka	Dužina najdužeg izdanka (mm)	Prosječna dužina izdanaka (mm)
0,2	1,7 A	8,8 A	7,5 A
0	1,5 A	8,5 A	7,7 A

*vrijednosti označene istim slovom unutar stupca ne razlikuju se signifikantno

Na temelju dobivenih rezultata nije utvrđena značajna razlika u broju izdanka, dužini najduljeg izdanka (mm) i prosječnoj dužini izdanka (mm) primjenom GA3 u hranidbenoj podlozi za mikropropagaciju. Stoga, nema signifikantne razlike između koncentracija 0 mg/L i 0,2 mg/L GA3.

Prema istraživanju na konopljiki (*Vitex negundo* L.), duljina internodija ovisi o koncentraciji GA3 u mediju. Najveća elongacija internodija postignuta je na koncentraciji 0,4 mg/L GA3 zajedno s 2 mg/L BAP. U našem istraživanju, GA3 nije polučila efekt na izduživanje stabljike možda zbog niske koncentracije. Supkultivacija nodalnih segmenata na mediju MS s 1 mg/L BAP i 0,4 mg/L GA3 pokazuje visok stupanj multiplikacije te ne dolazi do stvaranja kalusa (Sahoo i Chand, 1998). Barghchi (1987) je proveo istraživanje na bagremu (*Robinia pseudoacacia* L.). Aksilarni izdanci multiplicirani su na mediju MS uz dodatak 0,25-1,0 mg/L BAP, te je istražen i učinak giberelinske kiseline na rast i proliferaciju *in vitro*. GA3 1 mg/L nije utjecala na broj izdanaka po eksplantatu. Međutim, dužina izdanaka je reducirana, što je u suprotnosti s najčešće deklariranim učinkom GA3, a taj bi trebao biti izduživanje internodija.

5. Zaključak

Uspješno je provedena mikropropagacija pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) na hranidbenoj podlozi MS. Ispitivan je utjecaj različitih citokinina i vrsta eksplantata na uspješnost mikropropagacije, te njihova interakcija. Ispitivan je i utjecaj različitih vrsta agara i prisutnosti giberelinske kiseline. Na temelju provedenih istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- Nodalni segmenti (jedno ili dvonodalni) dali su signifikantno veći broj izdanaka u odnosu na mikroizdanke. Međutim, dužina najdužeg izdanka (mm) i prosječna dužina izdanaka (mm) bila je signifikantno veća kod mikroizdanaka.

- Eksplantati postavljeni na mediju MS s BAP (1,5 mg/L) su se signifikantno bolje razvili s dužim i većim brojem izdanaka, u odnosu na medij MS s ZEA (1,5 mg/L).

- Ukupan broj izdanaka je signifikantno veći na nodalnim segmentima postavljenim na BAP (2,7), u odnosu na ostale interakcije vrste eksplantata i citokinina. Dužina najdužeg izdanka signifikantno je veća kod mikroizdanaka (9,5 mm) i nodalnih segmenata (8,3 mm) na BAP i mikroizdanaka na ZEA (8,7 mm) u odnosu na nodalne segmente na ZEA (3,9 mm). Najveća prosječna dužina izdanaka (8,9 mm) ostvarena je na mikroizdancima na BAP, te ima signifikantno veću vrijednost od ostalih interakcija, osim mikroizdanaka na ZEA (7,8 mm) od kojih se ne razlikuje.

- Nije utvrđena signifikantna razlika između medija MS s 8 g/L Bacto agara i medija MS sa 7 g/L Plant agara za učinkovitost mikropropagacije.

- Nema signifikantne razlika niti između koncentracija GA3 0 mg/L i 0,2 mg/L u mediju MS za učinkovitost mikropropagacije.

Rezultati su dokazali da je BAP učinkovitiji od ZEA u formiraju većeg broja izdanaka, dužini najdužeg izdanaka i prosječnoj dužini izdanaka. Učinkovitost vrste eksplantata je varirala ovisno o mjerenom svojstvu. Primjena GA3 nije signifikantna te ukazuje na potrebu daljnjeg istraživanja s većim koncentracijama. Jedno od budućih istraživanja moglo bi se temeljiti na optimizaciji protokola za ukorjenjivanje i aklimatizaciju mikropropagiranih izdanaka pitomog kestena.

6. Literatura

1. Bačić T, Sabo M. (2007). Najvažnije medonosne biljke u Hrvatskoj. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek
2. Barghchi M. (1987). Mass clonal propagation in vitro of Robinia pseudoacacia L. (Black locust) cv. 'Jaszkiseri'. Plant Science. 53 (2) https://doi.org/10.1016/0168-9452(87)90129-4 (pristupljeno 18. srpnja 2018.)
3. Bučar M. (2008). Medonosne biljke kontinentalne Hrvatske: staništa, vrijeme cvjetanja, medonosna svojstva. Matica hrvatska, Petrinja
4. Chauvin JE, Salesses G. (1988). Advances in chestnut micropropagation (Castanea sp.). ISHS Acta Hortic. 227, 340-345 https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.227.62 (pristupljeno 21. srpnja 2018.)
5. Cicek E, Tilki F. (2007). Seed Size Effects on Germination, Survival and Seedling Growth of Castanea sativa Mill.. Journal of Biological Sciences, 7: 438-441 https://scialert.net/abstract/?doi=jbs.2007.438.441 (pristupljeno 18. srpnja 2018.)
6. Conedera M, Manetti MC, Giudici F, Amorini E. (2004). Distribution and economic potential of the Sweet chestnut (Castanea sativa Mill.) in Europe. Ecologia mediterranea. 30(2): 179 – 193.
7. Conedera M, Krebs P, Tinner W., Pradella M., Torriani D. (2004). The cultivation of Castanea sativa (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. Veget Hist Archaeobot. 13:161–179
8. Corredoira E, Ballester A, Vieitez FJ, Vieitez AM. (2006). Somatic embryogenesis in chestnut. U: Plant Cell Monographs, Somatic Embryogenesis. (Mujib A, Samaj J. (Ur.)). Springer, Berlin, Heidelberg. 2:177-199.
9. Cuenca B, Sánchez C, Aldrey A, Bogo B, Blanco B, Vidal N. (2017). Micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut (Castanea sativa × C. crenata) in liquid medium in a continuous immersion system. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 131 (2):307-320
10. De Vasconcelos MC, Bennett RN, Rosa EA, Ferreira-Cardoso JV. (2010). Composition of European chestnut (Castanea sativa Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. Journal of the Science od Food and Agriculture. 90:1578–1589

11. Domac R. (2002). Flora Hrvatske: priručnik za određivanje bilja II. izd. Školska knjiga, Zagreb
12. Dubravec KD. (1996). Botanika. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
13. Ertürk Ü, Cevriye M, Arif S. (2006). Chemical composition of fruits of some important chestnut cultivars. Agric, Agrib Biotechnol. 49(2):183–188. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132006000300001. (pristupljeno 3. srpnja 2018.)
14. FAO (2012). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Forestry mediabase. Chestnut fruit (Castanea sativa). http://ref.data.fao.org. (pristupljeno 16. srpnja 2018.)
15. Gonçalves JC, Diogo G, Amâncio S. (1998). In vitro propagation of chestnut (Castanea sativa × C. crenata): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. Sci. Hort. 72, 265-275.
16. Grdinić V, Kremer D. (2009). Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Hrvatska ljekarnička komora, Zagreb
17. Gresshoff PM, Doy CH. (1972) Development and differentiation of haploid Lycopersicon esculentum. Planta 107, 161-170.
18. Grlić Lj. (2005). Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. EX LIBRIS, Rijeka
19. Hulina N. (2011). Više biljke-stablašice, Sistematika i gospodarsko značenje. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb
20. Idžojtić M, Zebec M, Poljak I, Šatović Z, Liber Z. (2012). Analiza genetske raznolikosti "lovranskog maruna" (Castanea sativa Mill.) korištenjem mikrosatelitnih biljega. Šumarski list. 11–12: 577–585
21. Jelaska S. (1994). Kultura biljnih stanica i tkiva. Školska knjiga, Zagreb
22. Ježić M, Poljak I, Krstin L, Idžojtić M, Liber Z, Ćurković-Perica M. (2013). Chestnut blight disease threatens Lovran marron despite the presence of hypovirulent strains of the fungus Cryphonectria parasitica (Murrill) Barr. 4. Hrvatski Botanički Simpozij s međunarodnim sudjelovanjem.
23. Kakimoto T. (2003). Biosynthesis of cytokinins. J Plant Res. 116:233-239 https://doi.org/10.1007/s10265-003-0095-5 (pristupljeno 17. srpnja 2018.)
24. Kereša S. (2011). Biljna biotehnologija -interna skripta, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

25. Khela S. (2013). Castanea sativa. The IUCN Red List of Threatened Species 2013. http://www.iucnredlist.org/details/summary/202948/1. (pristupljeno 21. srpnja 2018.)
26. Krebs P, Conedera M, Pradella M, Torriani D, Felber M, Tinner W. (2004). Quaternary refugia of the sweet chestnut (Castanea sativa Mill.), an extended palynogogical approach. Vegetation History and Archaeobotany 13(3): 145-160 https://doi.org/10.1007/s00334-004-0041-z. (pristupljeno 3. srpnja 2018.)
27. Lloyd G, McCown B.H. (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, 30: 421-427.
28. Maurer WD, Fernández-Lopez J. (2001). Establishing in international sweet chestnut (Castanea sativa Mill) provenance test: preliminary steps. Forest Snow and Landscape Research. 76, 3: 482 – 486.
29. Mencarelli F. (2001). Postharvest handling and storage of chestnuts. Working document of the project: TCP/CPR/8925 „Integrated Pest Management of Storage of Chestnut in XinXian County, Henan Province, China". UN/FAO. http://www.fao.org/docrep/006. (pristupljeno 26. lipnja 2018.)
30. Mullins KV. (1987) Micropropagation of chestnut (Castanea sativa Mill.). ISHS Acta Horticulturae 212: Symposium on In Vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants
31. Murashige T, Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum. 15:473-497
32. Nikolić T. ur. (2015): Rasprostranjenost Castanea sativa Mill. u Hrvatskoj, Flora Croatica baza podataka. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. http://hirc.botanic.hr/fcd. (pristupljeno 21. srpnja 2018.)
33. Nikolić T. (2013). Sistematska botanika - Raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Alfa d.d., Zagreb
34. Nikolić T. ur. (2018). Mješovita šuma hrasta kitnjaka i pitomog kestena. Flora Croatica Database, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. https://hirc.botanic.hr:443/fcd/stanista/PrikazStanista.aspx?id=6091 (pristupljeno 18. srpnja 2018.)
35. Novak Agbaba S, Liović B, Medak J, Slade D. (2005). Chestnut research in Croatia. Acta Hortic. 693: 49-54

36. Novak-Agbaba S, Liović B, Pernek M. (2000). Prikaz sastojina pitomog kestena (Castanea sativa Mill.) u Hrvatskoj i zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr. Rad. Šumar. inst. 35 (1): 91–110
37. Osterc G, Fras MZ, Vonedik T, Luthar Z. (2005). The propagation of chestnut (Castanea sativa Mill.) nodal explants. Acta Agric. Slov. 85:2
38. Prgomet Ž, Mujić I, Bratović I, Novak Agbaba S, Pentek I., Šimunović V. (2011). Stanje i perspektiva uzgoja pitomog kestena u Istri. Skupština Istarske županije.
39. Prgomet Ž, Prgomet I, Brana S. (2013). Pitomi kesten. SKINK d.o.o.Rovinj, Rijeka
40. Sahoo Y, Chand P. (1998). Micropropagation of Vitex negundo L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. Plant Cell Reports 18: 301. https://doi.org/10.1007/s002990050576 (pristupljeno 18. srpnja 2018.)
41. Sánchez MC, San-José MC, Ferro E, Ballester A, Vieitez, AM. (1996). Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. J. Hortic. Sci. 72: 433-443.
42. Šimić F. (1980). Naše medonosno bilje. Nakladni zavod Znanje, Zagreb
43. Šugar I. (2008). Hrvatski biljni imenoslov. Matica hrvatska, Zagreb
44. Tetsumura T, Yamashita K. (2004). Micropropagation of Japanese chestnut (Castanea crenata Sieb. et Zucc.) seedlings. HortScience, 39(7), 1684-1687
45. Troch V, Sapeta H, Werbrouck S, Geelen D, Van Labeke MC. (2010). In vitro culture of chestnut (Castanea sativa Mill.) Using temporary immersion bioreactors. ISHS Acta Hortic. 885, 383-389. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.885.54 (pristupljeno 21. srpnja 2018.)
46. Umeljić V. (2004). U svijetu cvijeća i pčela – atlas medonosnog bilja (I. dio). Ilija Borković, Split
47. USDA. (2018). US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA Food Composition Databases https://ndb.nal.usda.gov/ (pristupljeno 25. srpnja 2018.)
48. Vieitez AM, Sänchez MC, García-Nimo ML, Ballester, A. (2007). Protocol for Micropropagation of Castanea Sativa. U: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits (Jain S. M., Häggman H. (Ur.)). Springer, Dordrecht. Santiago de Compostela. 299-312
49. Vieitez AM, Vieitez ML. (1980). Culture of chestnut shoots from buds in vitro. Journal of Horticulture Science, 55: 83-84.

50. Wani IA, Hamid H, Hamdani AM, Gani A, Ashwar BA. (2017). Physico-chemical, rheological and antioxidant properties of sweet chestnut (Castanea sativa Mill.) as affected by pan and microwave roasting. Journal of Advanced Research, 8(4), 399–405.
51. Xing Z, Satchwell M, Powell WA, Maynar CA. (1997). Micropropagation of American chestnut: increasing rooting rate and preventing shoot-tip necrosis. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant 33: 43-48.

7. Prilog

Popis kratica	Značenje
ANOVA	Analiza varijance
BAP	6-benzilaminopurin
GA3	Giberelinska kiselina
g/L	Gram po litri
IBA	Indol-3-maslačna kiselina
L	Litra
LSD	Najmanja značajna razlika
mg/L	Miligram po litri
Mill	Miller
mm	Milimetar
MS	Murashige i Skoog medij
mT	Metatopolin
NAA	1-naftalenoctena kiselina
ZEA	Zeatin
TDZ	Tidiazuron
WPM	Woody Plant Medium

Životopis

Ivona Cvitković je rođena 30. rujna 1993. godine u Zagrebu. Pohađala je Osnovnu školu Ivana Filipovića u Zagrebu, a svoje srednjoškolsko obrazovanje je stekla u Općoj Gornjogradskoj gimnaziji u Zagrebu. Preddiplomski studij Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2012. godine, te završava obranom završnog rada na temu „Kapar – načini razmnožavanja, uzgoj i nutritivna vrijednost“. Na diplomskom studiju 2016. godine nastavlja studiranje na smjeru Biljne znanosti. Tijekom studija obavljala je stručnu praksu na kulturi biljnog tkiva u laboratoriju Zavoda za Oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku. Odlično se služi engleskim jezikom i poznaje osnove talijanskog i ruskog jezika.