Komponente hranjive podloge u kulturi tkiva

Lovrić, Stojan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:330188

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Stojan Lovrić, apsolvent

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

KOMPONENTE HRANJIVE PODLOGE U KULTURI TKIVA

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Stojan Lovrić, apsolvent

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

KOMPONENTE HRANJIVE PODLOGE U KULTURI TKIVA

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Nada Parađiković, predsjednik
2. dr. sc. Monika Tkalec, mentor
3. doc. dr. sc. Tomislav Vinković, član

Osijek, 2017.

Sadržaj

1. Anorganske komponente hranjive podloge 1
2. Makroelemeti 3
2.1. Dušik 3
2.1.1. Urea 4
2.1.2. Glicin 5
2.1.3. Proteini 5
2.2. Fosfat 5
2.3. Kalij 7
2.4. Natrij 7
2.5. Magnezij 8
2.6. Sumpor 9
2.7. Kalcij 9
3. Mikroelementi 11
3. 1. Klorid 12
3.2. Mangan 13
3.3. Cink 13
3.4. Bor 13
3.5. Bakar i molibden 14
3.6. Kobalt 14
3.7. Aluminij i nikal 15
3.8. Jod 15
3.9. Silicij 16
3.10. Željezo 16
4. Organske komponente hranjive podloge 18
4.1. Vitamini 18
4.2. Razvoj vitaminskih mješavina 19
4.3. Specifični spojevi – mioinozitol 19
4.4. Povijesna uporaba u kulturi tkiva 20
4.5. Tiamin 20
4.6. Ostali vitamini 20
4.6.1. Pantotenska kiselina 20
4.6.2. Vitamin C 21

4.6.3. Vitamin D 21
4.6.4. Vitamin E 22
4.6.5. Folna kiselina i riboflavin 22
4.7. Ekstrakt kvasca 22
4.8. Ekstrakt od krumpira 23
4.9. Ekstrakt slada 23
4.10. Homogenat od banane 24
4.11. Kokosovo mlijeko / voda 24
5. Organske kiseline 25
5.1. Upotreba kao puferi 25
6. Šećeri – nutritivni i regulacijski učinci 27
6.1. Alternative saharoze 27
6.2. Maltoza 27
6.3. Laktoza 28
6.4. Kukuruzni sirup 28
6.5. Neuobičajeni šećeri 29
6.6. Šećerni alkoholi 29
7. Biljni hormoni 30
7.1. Auksini 30
7.2. Giberelini 30
7.3. Citokinini 30
7.4. Apscizinska kiselina 31
8. Ostali sastojci – sredstva za skrućivanje 32
8.1. Agar – agar 32
8.2. Želatina 32
8.3. Pektin 32
9. Zaključak 33
10. Popis literature 34
11. Sažetak 46
12. Summary 47
13. Popis slika 48
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 49
BASIC DOCUMENTATION CARD 50

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Moniki Tkalec na mogućnosti izrade ovog rada. Hvala na konstruktivnim savjetima, pomoći prilikom pisanja rada, trudu i uloženom vremenu. Veliko hvala i svim mojim prijateljima, kolegama i poznanicima na strpljenju i suradnji. Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, djedu i baki, što su mi omogućili ovaj studij. Hvala za bezuvjetnu ljubav, podršku, razumijevanje te posebice za strpljenje.

1. Anorganske komponente hranjive podloge

In vitro uzgoj biljnih tkiva i organa odvija se na hranjivoj podlozi koja sadrži neophodne elemente za rast i razvoj same biljke. Uspješnost kulture biljnog tkiva kao načina razmnožavanja uvelike ovisi o sastavu hranjive podloge. Za zdrav i snažan rast, cijele biljke trebaju usvojiti iz tla:

1. Relativno velike količine nekih anorganskih elemenata (makroelemenata): ione dušika (N), kalija (K), kalcija (Ca), fosfora (P), magnezija (Mg) i sumpora (S)
2. Malih količina drugih elemenata (mikroelemenata): željeza (Fe), Nikla (Ni), klora (Cl), mangana (Mn), cinka (Zn), bora (B), bakra (Cu) i molibdena (Mo)

Danas je opće prihvaćeno da se neophodnost kemijskih elemenata za život biljaka utvrđuje prema Arnonu i Stoutu (1939.):

1. element mora biti potreban tijekom cijelog životnog ciklusa biljaka,
2. element mora imati posebnu funkciju koju ne može obavljati drugi element i
3. element mora imati neposrednu ulogu u biljnom metabolizmu, odnosno mora biti potreban za obavljanje specifične fiziološke funkcije.

Naknadno su Arnon i Stout dodali i četvrto pravilo, koje glasi:

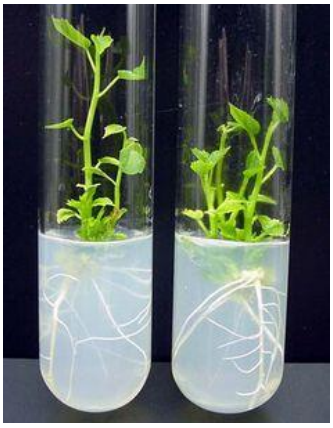
4. element mora biti potreban za više od dvije biljne vrste da bi se smatrao neophodnim.

Gore navedeni elementi zajedno sa ugljikom (C), kisikom (O) i vodikom (H) čine 17 esencijalnih elemenata. Drugi elementi, kao što su kobalt (Co), aluminij (Al), natrij (Na) i jod (I), su esencijalni ili korisni samo za neke vrste dok se za sve ostale to još uvijek treba utvrditi (George, 2008.).

Najčešće upotrebljavana hranjiva podloga je prema formulaciji Murashige i Skoog (1962.). Ova hranjiva podloga razvijena je za optimalni rast tkiva duhana, a sam razvoj podloge uključivao je veliki broj krivulja različitih doza pojedinih esencijalnih elemenata.

Murashige i Skoog hranjiva podloga (MS) sadrži relativno male vrijednosti Ca, P i Mg (George, 2008.).

Hranjive podloge u kulturi tkiva (Slika 1.) ne osiguravaju samo anorganske hranjive tvari, nego obično i ugljikohidrate kako bi zamijenila ugljik koji biljke obično fiksiraju iz atmosfere fotosintezom. Kako bi se poboljšao rast, mnoge hranjive podloge sadrže u tragovima određene organske spojeve, značajne vitamine te biljne regulatore rasta.
Iako je važno da je hranjiva podloga svaki put ista, tvari čiji sastav može varirati je najbolje izbjegavati ukoliko je moguće, iako se ponekad postižu bolji rezultati njihovim dodavanjem (George, 2008.).



Slika 1. Prikaz hranjive podloge u kulturi tkiva

Izvor: https://www.pinterest.com/pin/539587599083044765/

Hranjiva podloga za kulturu tkiva sastoji se od otopina slijedećih komponenti:

- Makroelementi
- Mikroelementi
- Šećer
- Biljni regulatori rasta
- Vitamini
- Sredstvo za skrućivanje
- Aminokiseline i ostale zamjene za dušik
- Nedefinirane zamjene kao što su mlijeko kokosa
- Puferi

2. Makroelemeti

2.1. Dušik

Dušik (Slika 2.) je ključan za život biljke, on je sastojak i proteina i nukleinskih kiselina te se također pojavljuje u klorofilu. Dušik se nalazi u atmosferi kao N_2, ali samo leguminoze su u mogućnosti iskoristiti taj dušik koristeći bakteriju roda *Rhizobium* u korjenovim kvržicama. Većini biljaka jedini izvor dušika je nitrat (NO_3^-). Nakon usvajanja NO_3^- se reducira u NH_4^+ prije ugradnje u organske molekule (zamjena kisika tj. izdvajanje kisika i njegova zamjena vodikom u kemijskom spoju se zove redukcija). Važnost dušika predočuje velika količina rezervi dušika u sjemenu (uskladišteni proteini).

Većina podloga sadrži više nitrata nego amonijevih iona, ali kako podloge kulture biljnih tkiva nisu uglavnom namjerno puferirane dodane koncentracije amonijačnih i nitratnih iona su ondje vjerojatno više radi praktične pH kontrole nego zbog potrebe biljnih tkiva za jednim ili drugim oblikom dušika. Usvajanje nitrata se efikasno događa jedino u kiselom pH, ali je praćeno izdvajanjem aniona iz biljke što vodi do postupnog smanjenja kiselosti podloge (George, 2008.).



Slika 2. Dušik

Izvor: https://infograph.venngage.com/p/101210/nitrogen

Podloga biljne kulture obično počinje s pH vrijednosti 5.4 - 5.8, no u onoj koja sadrži i nitratne i amonijačne ione brzo usvajanje amonija u biljno tkivo uzrokuje da vrijednost pH padne na 4.2 - 4.6.

Manjak dušika u serijskim kulturama pokreće povećanje u metabolizmu nekih komponenti bez dušika temeljenih na fenilpropanima (kao što je lignin), koji su povezani s diferencijacijom sekundarno zadebljalih stanica (Hahlbrock, 1974.).

Ioni nitrata su važan izvor dušika za većinu biljnih kultura i gotovo sve podloge pružaju većinu svog dostupnog dušika u ovom obliku. Za razliku od amonijačnih iona nitrat nije toksičan i u većine biljaka puno ga se transportira u izdanke zbog asimilacije. S druge strane, ion nitrata može postati toksičan ako se nakupi unutar tkiva biljke ili u podlozi, npr., kada uvjeti rasta nisu povoljni za visoku aktivnost nitrit reduktaze i kada je nitrat jedini izvor dušika (Jordan i Fletcher, 1979.; Grimes i Hodges, 1990.). Kod biljke *Pinus pinaster* nitrat reduktaza je inducirana prisutnošću KNO_3 i biljke regenerirane *in vitro* pokazuju sposobnost da reduciraju nitrat kao i klijanac (Faye i sur., 1986.).

U većini tipova kultura nitratni ion mora biti dostupan zajedno sa reduciranim oblikom dušika (često NH_4^+ ion) i tkiva možda neće rasti na podlozi sa NO_3^- kao jedinim izvorom dušika (Hunault, 1985.). Ako su NH_4^+ i ostali reducirani spojevi dušika dostupni (ovo je posebno slučaj u aseptičkom *in vitro* okruženju) oni mogu biti usvojeni i efektivno iskorišteni od strane biljaka.
Čini se kako organske kiseline umanjuju kiselost hranjive podloge usvajanjem NH_4^+ iona. Slično, kalus internodija biljke Asparagusa rastao je jednako dobro na hranjivoj podlozi koja je sadržavala NH_4^+ ione kao jedini izvor dušika kao i na podlozi koja je sadržavala i NH_4^+ i NO_3^- ione, ali samo uz dodatak organskih kiselina (citratna ili malatna) ili MES pufera u hranjivoj podlozi.

2.1.1. Urea

Biljke su sposobne apsorbirati ureu iako kao amonijačni ion ona nije supstanaca koja je uobičajeno dostupna u prirodnim tlima. Urea nastaje kao nusproizvod metabolizma dušika te se manje količine nalaze u mnogim višim biljkama koje su sposobne iskoristiti ureu kao izvor dušika pod uvjetom da se ona prvo pretvori u amonijačne ione od strane enzima ureaze. Leguminozama i krumpiru treba mirkoelement nikal kako bi ureaza bila aktivna (Durzan, 1987.). Urea se može koristiti kao jedini izvor dušika za kulture, ali je rast sporiji nego kada ih opskrbljujemo amonijačnim i nitratnim ionima (Kirkby i sur., 1987.). Enzim ureaze se povećava nakon što su kulture održavane nekoliko serija na podlozi na bazi uree (King, 1977.; Skokut i Filner, 1980.).

2.1.2. Glicin

Glicin je jedan od sastojaka hranjive podloge. Obično se dodaje u malim količinama te je uvršten od strane nekih istraživača među sastojke vitamina. Unatoč čestoj upotrebi, teško je pronaći čvrsti dokaz da je glicin uistinu neophodan za kulturu tkiva, no moguće pomaže u protekciji stanične membrane od osmotskog i temperaturnog stresa (Orczyk i Malepszy, 1985).

White (1939.) je u svom istraživanju pokazao da korijen rajčice raste bolje na hranjivoj podlozi koja sadrži glicin umjesto ekstrakta kvasca te kako glicin može zamijeniti mješavinu devet aminokiselina koja se prije upotrebljavala.

2.1.3. Proteini

Proteini, koji su hidrolizirani kiselinom ili enzimima i tako podijeljeni u manje molekule, su jeftiniji nego identificirane aminokiseline. Hidrolizat koji se najčešće koristio u kulturi hranjive podloge je iz mliječnog proteina, kazein, iako je laktalbumin hidrolizat već primijenjen (La Motte i Lersten, 1971.). Peptoni i tripton su rjeđe korišteni, no postoje istraživanja koja potvrđuju njihovu korist kada su dodani hranjivoj podlozi (npr. Muralidhar i Mehte 1982., Pierik i sur., 1988.). Hidrolizat kazeina utjecao je na poboljšani rast suspenzije stanica biljaka *Cardamine pratensis* i *Silene alba*, samo kada je u hranjivoj podlozi manjak fosfora.

2.2. Fosfat

Fosfor je važan element u biljnoj biokemiji. Javlja se u brojnim makromolekulama kao što su nukleinske kiseline, fosfolipidi i koenzimi. Djeluje u prijenosu energije preko pirofosfatne veze u ATP-u. Fosfatne skupine vezane na različite šećere daju energiju u disanju i fotosintezi te fosfatnu vezu proteinima koji reguliraju njihovu aktivnost. Fosfor se apsorbira u biljke u obliku primarnog ili sekundarnog ortofosfatnog aniona $H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-} aktivnim procesom koji zahtijeva utrošak energije disanja. Fosfat, za razliku od dušika i sulfata, se ne smanjuje u biljkama, ali ostaje u vrlo oksidiranom obliku. Koristi se u biljkama kao potpuno oksidirani ortofosfat (PO_4^{3-}) obliku (George, 2008.).

Element se u hranjivu podlogu dodaje u obliku topivog kalijeva mono- i di-hidrogenfosfata. Di- i mono- valentni fosfat anioni, se međusobno pretvaraju jedan u drugi ovisno o pH otopine. Monovalentni $H_2PO_4^-$ prevladava kod pH vrijednosti ispod 7,

karakterističan je za većinu hranjivih podloga kulture biljnog tkiva i fosfatni je ion koji se najlakše apsorbira u biljke (Devlin, 1975.).

Optimalna brzina usvajanja fosfata (HPO_4^{2-}) u kulturi stanica petunije zabilježena je pri pH 4 (Chin i Miller, 1982.), ali Zink i Veliky (1979.) nisu uočili nikakav pad u apsorpciji fosfata kod kulture stanične suspenzije ukrasnog slaka (*Ipomoea*) pri pH 6,5 kada su HPO_4^{2-} i $H_2PO_4^-$ bili prisutni u približno jednakim koncentracijama.

Iako je sadržaj fosfata u nekim hranjivim podlogama kulture biljnog tkiva iznosi i do 19.8 mM, prosječan sadržaj je 1.7 mM dok većina hranjivih podloga sadrže 1.3 mM.

U kulturi stanične suspenzije vinke (*Catharanthus roseus*) (Slika 3.) jedini nutrijenti koji su se do kraja utrošili bili su fosfat (početnog sadržaja 2.6 mM) i šećer te se period rasta mogao produžiti jedino povećanjem sadržaja ta dva nutrijenta (MacCarthy i sur., 1980.).

Fosfat u MS hranjivoj podlozi nedovoljan je za kulturu stanične suspenzije livandne režuhe (*Cardamine pratensis*) gdje se u potpunosti apsorbira u svega pet dana, no dostatan je za kulturu stanične suspenzije pušine (*Silene alba*) (Bister-Miel i sur., 1985.).

Nedovoljne količine fosfata u MS hranjivoj podlozi bile su zabilježene kod uzgoja ljiljana (*Hemerocallis*), perunika (*Iris*) i kokotića (*Delphinium*) (Leiffert i sur., 1995.).

U tekućoj hranjivoj podlozi dalija usvoji fosfat gotovo u potpunosti za 2 tjedna. Nakon iskorištenja koncentracija fosfora u tkivu je normalna. Iskorištenje fosfata u ranoj fazi kulture ima veliki utjecaj na pH hranjive podloge u kojoj je fosfat ujedno i puferna komponenta (George, 2008.).



Slika 3. Madagaskarski zimzelen; Vinka (*Catharanthus roseus* L.)

Izvor: http://www.plantsrescue.com/catharanthus-roseus/

2.3. Kalij

Ovaj se element "brine" za čvrstoću tkiva biljke i za stabilnu strukturu. Kalij je sadržan u većini vrsta tla, no mikroorganizmi ga moraju pretvoriti u oblike koji su prihvatljivi biljkama. Kalijevi ioni očito će imati sličnu ulogu u kulturi tkiva, ali će obično nedostajati mehanizma za transport. Mnogi proteini pokazuju visoku specifičnost za kalij koji, djelujući kao kofaktor, mijenja svoj oblik tako da oni postanu aktivni enzimi. U biljkama, nedostatak kalija rezultira gubitkom turgora, mlohavim tkivom i povećanom osjetljivosti na sušu, slanost, smrzavanje i gljivične napade.

Nedostatak kalija u hranjivim podlogama za kulturu biljnog tkiva može dovesti do hiperhidriciteta (Pasqualetto i sur., 1988.), te smanjenja stope apsorpcije fosfata (Chin i Miller, 1982.). No vrlo široke varijacije u sadržaju kalija u MS hranjivim podlogama imale su mali učinak na rast i proliferaciju uzgajanih mladica breskve (Loreti i sur., 1988.).

2.4. Natrij

Ioni natrija (Na^+) se usvajaju u biljke, ali u većini slučajeva nisu potrebni za rast i razvoj i mnoge ih biljke aktivno izlučuju kroz korijen kako bi u sebi održale nisku koncentraciju.

Natrij ima koristan nutritivni učinak na neke biljke i stoga se smatra funkcionalnim elementom (Subbarao i sur., 2003.). Male količine natrijeva klorida (npr. 230 mg/L), može stimulirati rast biljaka u porodicama *Chenopodiaceae* i *Compositaece* čak i kad ne postoji ograničenje dostupnosti K^+ (Brownell, 1979.). U drugim biljkama, kao što su pšenica, zob, pamuk i cvjetača (Sharma i Singh, 1990.), natrij može djelomično zamijeniti kalij, ali nije esencijalan.

Natrij je esencijalan kod onih biljaka tolerantnih na sol koje imaju C4 - kiselinski metabolizam, a to su *Bryophyllum tubiflorum* (Tustikovke) (Slika 4.) i *Mesembryanthemum crystallimum* (Čupavice). U tim biljkama ovaj element je neophodan za fiksaciju CO_2 u fotosintezi (George, 2008.).



Slika 4. Biljka *Bryophyllum tubiflorum* L.
Izvor: https://delange.org/ChandelierPlant/ChandelierPlant.htm

2.5. Magnezij

Magnezij je esencijalna komponenta molekule klorofila, a također je potreban za aktivnost mnogih enzima, posebno onih koji su uključeni u prijenos fosfata. Unutar biljaka, magnezijev ion je mobilan i širi se slobodno te na taj način, kao i kalij, služi kao kation za balansiranje i neutraliziranje aniona i organskih kiselina (George, 2008.).

Hranjive podloge kulture biljnog tkiva uvijek sadrže relativno niske koncentracije magnezija (prosječno 6.8 mM). Walker i Sato (1981.) utvrdili su da postoji značajno smanjenje broja somatskih embrija nastalih od kalusa lucerne (*Medicago sativa*) (Slika 5.) kada je Mg^{2+} izostavljen iz hranjive podloge. U skladu s ovim istraživanjem, Kintzios i sur., (2004.), opazio je da u kulturi tkiva dinje izravne somatske embriogeneze su se javile u kulturama sa najvišim sadržajem magnezija dok se kalusne kulture najbolje razvijaju pri najnižim sadržajima magnezija.



Slika 5. Lucerna (*Medicago sativa* L.)

Izvor: http://www.naturespot.org.uk/species/lucerne

2.6. Sumpor

Sumpor kojeg koriste biljke uglavnom se apsorbira kao SO_4^{2-}, što je i uobičajen izvor elementa u hranjivim podlogama kulture biljnog tkiva. Usvajanje se spaja s asimilacijom dušika (Reuveny i sur., 1980.), te se smatra neovisnim o pH. To je rezultat izlučivanja OH^- iona od strane biljke, što hranjivu podlogu čini više alkalnom.

Sumpor je, dakle, bitan element i nedostatak rezultira nedostatkom sinteze proteina. Biljke s manjkom sumpora su krute, krhke i tanke stabljike. Rast i sintezu proteina u kulturi stanične suspenzije duhana se smanjuje u hranjivoj podlozi koja sadrži samo 0,6 mM SO_4^{2-} umjesto 1,73 mM (Klapheck i sur., 1982.), a kada se iskoristi sav sumpor u hranjivoj podlozi, velike količine topljivog dušika se akumulira u stanicama. Većina hranjivih podloga sadrže od 1 - 2,5 mM/L SO_4^{2-}.

2.7. Kalcij

Kao makro kation, kalcij pomaže ravnoteži aniona u biljci, ali za razliku od kalija i magnezija, nije lako pokretljiv. Sintaza enzima β - glukana ovisi o kalcijevim ionima i sinteza celuloze iz kulture stanica se ne događa ukoliko ne postoje barem mikro - molarne količine Ca^{2+} u hranjivoj podlozi. Mnogi drugi biljni enzimi su također ovisni o kalciju te je on kofaktor u enzima odgovornih za hidrolizu ATP.

Kalcij pruža zaštitu od djelovanja teških metala i doprinosi otpornosti prema pretjerano zaslanjenim uvjetima i uvjetima niskog pH (George, 2008.).

Ca^{2+} ion je uključen u *in vitro* morfogenezu te je potreban za mnoge odgovore na inducirani rasta biljaka pomoću biljnih hormona, posebice auksina i citokinina. U mahovini (*Funaria*), citokinin uzrokuje povećanje Ca^{2+} povezanog sa membranom posebno u onim područjima koja su u postupku diferencijacije u pupoljak (Saunders i Hepler, 1981.). Kod segmenata stabljike torenije (*Torenia*) (Slika 6.), formacija adventivnih pupova inducirana citokininom bila je osrednja, barem djelomično, povećanjem razine Ca^{2+} unutar stanica (Tanimoto i Harada, 1986.).

Nedostatak kalcija u biljkama rezultira slabim rastom korijena te tamnjenjem i uvijanjem rubova apikalnog lišća, često popraćeni prestankom rasta i odumiranjem vrha izbojka.

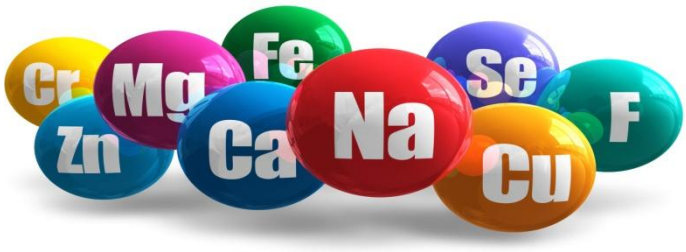


Slika 6. Torenija (*Torenia fournieri* L.)

Izvor: http://www.gardening-guy.com/tag/torenia/

3. Mikroelementi

Zahtjevi biljaka prema mikroelemenatima razjašnjeni su tek u posljednjih 50 - 60 godina. Prije kraja prošlog stoljeća znalo se da nedostatak željeza uzrokuje pomanjkanje klorofila kod biljkama, no da bi se dokazala važnost ostalih elemenata bilo je potrebno mnogo godina istraživanja. U začecima istraživanja kulture biljnog tkiva postajala je nesigurnost vezana za esencijalnost pojedinih mikroelemenata. Mnoga tkiva su nesumnjivo uspješno uzgajana jer su kultivirana na hranjive podloge pripremljene od nečistih kemikalija ili ukrućene agarom koji je djelovao kao izvor mikroelemenata (George, 2008.).



Slika 7. Mikroelementi

Izvor: http://www.playbuzz.com/eirabellaakoi10/which-chemical-reaction-would-create-you

Knudson (1922.) je dodao željezo (Fe) i mangan (Mn) svojoj vrlo uspješnoj hranjivoj podlozi za nesimbiotsku klijavost sjemena orhideje, a po preporuci Berthelot (1934.), Gautheret (1939.) i Nobécourt (1937.) dodaje (kao dodatak željezu) i bakar, kobalt, nikal, titan i berilij. Utvrđeno je da je cink neophodan za normalan razvoj korijenovog sustava rajčice (Eltinge i Reed, 1940.) te da bez Cu korijenje prestaje rasti (Glasstone, 1947.).

Mikroelementi se danas dodaju hranjivim podlogama u obliku standardiziranih kemikalija. Street (1977.) je s pravom istakao da čak i kemikalije analitičke čistoće sadrže tragove nečistoća koje će biti skrivena opskrba mikroelemenata hranjivoj podlozi.
To potvrđuje istraživanje Dalton i sur. (1983.), koji su pronašli tragove silicija (Si) u ostacima MS hranjive podloge koja napravljena s kemikalijama analitičke čistoće. Sredstva za učvršćivanje hranjive podloge sadrže anorganske elemente, no da li ih kultura može

koristiti još nije potvrđeno. Količine nečistoća u kemikalijama bile su veće u prošlim vremenima, a danas s visokim standardima pročišćenja kemikalija neće imati sasvim isti sastav kao i kada ju je prvi put spravio Knudson 1922. godine. Dodatak nekih mikroelemenata može poboljšati rezultate dobivene spravljanjem takvog ranog medija u današnje vrijeme.
Većina modernih hranjivih podloga koriste mikroelemente iz B5 hranjive podloge Gamborg i sur., (1968.), ili više koncentriranu mješavinu iz MS ili H hranjivih podloga Bourgin i Nitsch (1967.).

Visok sadržaj mikroelemenata koristili su Barwale i sur., (1986.) u svom istraživanju za poticanje adventivnih izboja iz kalusa 54 genotipova soje (*Glycine max*) što su postigli četiri puta većom koncentracijom mikro soli u MS hranjivoj podlozi.

Kako bi smanjio pojavu hiperhidriciteta u kulturi izbojaka karanfila, Dencso (1987.) smanjuje sadržaj mikroelemenata (osim željeza, kao što je preporučeno od strane Dalton i sur., 1983.) od one u MS hranjivoj podlozi, no ova kombinacija nije odgovarala kulturi izbojaka gerbera pa je brzina propagacije bila manja nego pri normalnim koncentracijama MS soli.

3. 1. Klorid

Klorid ion (Cl^-) je neophodan za rast biljaka (Broyer i sur., 1954.;. Johnson i sur., 1957.;. Ozanne i sur., 1957.;. Ozanne, 1958.), ali čini se da je uključen u samo nekoliko bioloških reakcija te su samo vrlo male količine stvarno potrebne. Rains (1976.) je klor svrstao kao mikroelement. Uloga klorida čini se da je u održavanju turgora i balansiranje brze promjene sadržaja slobodnih kationa, kao što su K^+, Mg^{2+} i Na^+. Biljke lišene Cl^- sklone su venuću (Johnson i sur., 1957.). Klorid ioni se najbolje usvajaju u biljke pri blago kiselom pH (Jacobson i sur., 1971.). Kako klor ima samo relativno mali nutritivni značaj, ponekad se poduzimaju koraci kako bi se smanjila koncentracija iona klorida u hranjivim podlogama, ali da bi se prilagodila koncentracija drugih iona, tada je često potrebno napraviti značajan porast SO_4^{2-}. Na primjer, koristeći amonij sulfat umjesto amonij klorid za opskrbu NH_4^+ u Y3 hranjivoj podlozi Eeuwens (1976.), podiže se razina sulfata od 1 do 6 mM/L.

3.2. Mangan

Mangan (Mn) je jedan od najvažnijih mikroelemenata i uključen je u većini hranjivih podloga za kulturu biljnog tkiva. Obično se dodaje u sličnim koncentracijama kao onima željeza i bora, odnosno između 25 - 150 mM. Mangan ima slična kemijska svojstva Mg^{2+} te očito u stanju zamijeniti magnezij u nekim enzimskih sustavima (Hewitt, 1948.).
Mangan je neophodan za održavanje ultra - strukture kloroplasta. Mangan je toksišan u visokim koncentracijama (Sarkar i sur., 2004.). U kulturama tkiva, izostavljanjem Mn iona iz Doerschug i Miller (1967.) hranjive podloge smanjio se broj pupova iniciranih na kotiledonima salate. Smatra se da se prirodne razine auksina smanjuju u prisutnosti Mn^{2+} jer je aktivnost IAA-oksidaze povećana.

3.3. Cink

Cink je sastavni dio stabilnih metalo-enzima s brojnim različitim funkcijama. Nedostatak cinka kod biljaka utječe na smanjene aktivnosti enzima i posljedičnom smanjenju proteina, nukleinskih kiselina i sintezu klorofila. Biljke koje imaju nedostatak molibdena i cinka imaju smanjen sadržaj klorofila i slabo razvijene kloroplaste. Koncentracija Zn^{2+} u MS hranjivoj podlozi iznosi 30 μM, no sadržaj u hranjivim podlogama često varira između 0.1-70 μM, a eksperimentalnih rezultata koji pokazuju najprikladniji sadržaj je vrlo malo (George, 2008.). Kad je Eriksson (1965.) dodao je 15 mg/L $Na_2ZnEDTA \times 2H_2O$ (40μM Zn^{2+}) kulturi stanica *Haplopappus gracilis*, zabilježio je povećanje od 15% u suhoj masi stanica što se smatralo da je zbog prisutnosti cinka, a ne kelata. Također, pokazalo se da je cink utjecao na povećanje rasta stanične suspenzije riže. Najveća testirana koncentracija, 520μM, rezultirala je najbržom stopom rasta te smatralo da je cink povećao aktivnosti auksina (Hossain i sur., 1997.). Cink je potreban za formiranje adventivnog korijenja eukaliptusa (Schwambach i sur., 2005.).

3.4. Bor

Bor spada u rijetke elemente koji su široko rasprostranjeni po Zemljinoj površini. Bor je potreban za održavanje meristemske aktivnosti, vjerojatno zato što je uključen u sintezu N-baza koje su potrebne za sintezu RNA (Mengel i Kirkby, 1982.). Također, smatra se da je

uključen u održavanje membranske strukture i funkcije, moguće stabiliziranjem prirodnih metalnih kelata koji su važni u stanici i strukturi i funkciji membrane (Pollard i sur, 1977.; Clarkson i Hanson, 1980.).

U tlu, bor se javlja u obliku borne kiseline i to je spoj koji se općenito koristi kao izvor bora u kulturi tkiva. Širok raspon koncentracija bora korišten je u hranjivim podlogama, najčešće između od 50 i 100 μM, MS hranjiva podloga sadrži 100 μM. Bowen (1979.) je u svom istraživanju zabilježio da koncentracije bora iznad 2 mg/L (185 μM) su toksične za suspenziju stanica šećerne trske, no postoje i neka izvješća o korištenju većih koncentracija bora. Visoke koncentracije bora mogu imati regulativnu fukciju; na primjer, 1,6 - 6,5 mM su korištene u jednostavnim hranjivim podlogama za poticanje klijavosti peluda (Brewbaker i Kwack, 1963.; Taylor, 1972.).

3.5. Bakar i molibden

Bakar je esencijalni mikroelement iako biljke obično sadrže samo nekoliko ppm-a tog elementa. Postoje dvije vrste iona bakra, monovalentni bakrov [Cu (I)] ion i dvovalentni bakrov [Cu (II)] ion: prvi lako oksidira u drugi koji se lako reducira. Bakar se veže na enzime, koji se većina spajaju i reagiraju s kisikom.

Većina hranjivih podloga kultura sadrže 0,1 - 1,0 μM Cu^{2+} Ioni se obično dodaju kroz bakar sulfat, iako povremeno primjenjuju i bakarov klorid ili bakrov nitrata. U hidroponskom uzgoju *Trifolium pratense*, usvajanje bakra u biljku ovisilo je o količini nitrata u otopini. Usvajanje bakra se znatno smanjuje kada je NO_3^- iskorišten (Jarvis, 1984.). Koncentracija Cu u hranjivoj podlozi kulture tkiva je vrlo malena u usporedbi s razinom bakra u biljkama.

Biljke koriste šesterovalentni molibden koji usvajaju kao molibdatni ion (MoO_4^{2-}). Obično se dodaje u hranjivu podlogu u obliku natrij molibdata u koncentracijama do 1 mM.

3.6. Kobalt

Kobalt se ne smatra esencijalnim elementom. Ipak, utvrđeno je da je kobalt uvršten u gotovo polovicu objavljenih hranjivih podloga kulture biljnog tkiva (George i sur., 1987.). Murashige i Skoog (1962.) dodali su kobalt u njihovoj hranjivoj podlozi jer se pokazalo da

je koristan kod nižih biljaka (Holm-Hansen i sur, 1954.), te da bi to moglo imati ulogu u reguliranju morfogeneze u viših biljka (Miller 1954.; Salisbury, 1959.).

3.7. Aluminij i nikal

Vjerovalo se da većini biljaka Ni^{2+} nije apsolutno potreban za normalan rast i razvoj (Mishra i Kar, 1975.). Međutim, u novije vrijeme, detaljnijim istraživanjem otkriveno je kako je nikal esencijalni element (Gerendás i sur., 1999.). Smatralo se kako će aluminij biti potreban za rast nekih paprati (Taubck, 1942.), ali se općenito ne dodaje hranjivoj podlozi kulture tkiva za razmnožavanje paprati.

3.8. Jod

Jod nije prepoznat kao esencijalan element za ishranu bilja (Rains, 1976.), iako može biti potreban za rast nekih algi te se male količine akumuliraju u višim biljkama (12 i 3 mol/kg suhe mase u kopnenih odnosno vodenih biljaka) (Raven, 1986.). Međutim, jodid ion je dodan mnogim hranjivim podlogama kulture biljnog tkiva (u oko 65% formulacija mikroelemenata). Naime, praksa dodavanja joda hranjivim podlogama započela je objavom istraživanja White (1938.) koje je pokazalo poboljšan rast korijena rajčice uzgojenih *in vitro* uz prisutnost joda.
Eeuwens (1976.) je dodao 0,05 mM kalijeva jodida svojoj Y3 hranjivoj podlozi (deset puta veći sadržaj nego u Murashige i Skoog hranjivoj podlozi) te je spriječio tamnjenje kulture tkiva kokosove palme (Slika 8.). Prisutnost 0.06 μM kalijevog jodida malo je poboljšala opstanak i rast tkiva prunusa (*Prunus*) (Quoirin i Lepoivre, 1977.).



Slika 8. Kokosova palma

Izvor: http://cajeviza.net/kokosova-palma-uzgoj-u-saksiji/

3.9. Silicij

Silicij (Si) je drugi najrasprostranjeniji element na površini zemlje. Silikat ion se obično ne dodaje hranjivim podlogama kulture tkiva, ali je vjerojatno da će biti prisutan u niskim koncentracijama. Adatia i Besford (1986.) su otkrili da u hidroponskom uzgoju krastavca biljke koje su usvojile silicij iz hranjive otopine su imale čvršće lišće, veću svježu masu po jedinici površine i veći sadržaj klorofila u odnosu na kontrolne biljke. Otpornost biljaka na pepelnicu se uvelike povećala.

3.10. Željezo

U Zemljinoj kori željezo (Slika 9.) je najrasprostranjeniji metalni element i po masenom udjelu odmah je iza aluminija. Željezo je poznato od pradavnih vremena, a danas je sigurno najvažniji tehnički metal koji se upotrebljava na mnogo načina. Metali mogu biti vezani (ili izdvojeni) pomoću kelatnih agensa i održavati se u otopini u uvjetima gdje slobodni ioni reagiraju s anionima te tvore netopljive spojeve, a neki kompleksi spojevi mogu biti kemijski reaktivniji od samih metala.

Željezo je esencijalan mikroelement za hranjive podloge biljne kulture tkiva te se dodaje u obliku soli kao Fe^{2+} ili Fe^{3+}. U ranim eksperimentima, željezo sulfat ili željezo citrat ili tartarat korišteni su u hranjivoj podlozi kao izvor željeza. Limunska i tartaratna kiselina može djelovati kao kelatni agensi za neke dvovalentne metale (Bobtelsky i Jordan, 1945.).

Kod hidroponskog uzgoja biljka, prednosti dodavanja željeza hranjivim otopinama u obliku kelata s EDTA (Etilendiamintetraoctena kiselina) je prvi put prepoznata 1950. godine (Jacobson, 1951.; Weinstein i sur., 1951.). Street i sur., (1952.), uskoro su otkrili da željezo u ovom obliku manje toksično, a može se koristiti u *in vitro* kulturama izoliranih stanica korijena rajčice pri širem rasponu pH vrijednosti nego željezo citrat.

U novije vrijeme kod kulture biljnog tkiva EDTA se dodaje hranjivim podlogama u ekvimolarnoj koncentraciji sa željezom, gdje će se teoretski formirati kelati sa svim željezom u otopini. Međutim, u praksi je utvrđeno da je Fe (III) - EDTA kelat, iako stabilan pri pH 2 - 3, je podložan gubitku nešto vezanog željeza u hranjivoj podlozi pri većim vrijednostima pH (Dalton i sur., 1983.).



Slika 9. Simbol elementa željeza načinjen od sjemenki suncokreta

Izvor: https://www.123rf.com/photo_14944897_fe-is-the-name-of-the-iron-in-the-periodic-table-made-by-sunflower-seeds-that-come-from-a-source-of-.html

4. Organske komponente hranjive podloge

To su uglavnom vitamini (uključujući neke tvari koje nisu strogo životinjski vitamini), aminokiseline i određeni nedefinirani dodaci. Količina tih tvari potrebna za uspješnu kulturu varira s vrstom i genotipom i vjerojatno je odraz sintetičkog kapaciteta eksplantata.

4.1. Vitamini

Vitamini su spojevi koji su potrebni životinjama u vrlo malim količinama kao nužni pomoćni hranjivi čimbenici. Odsutnost od prehrane dovodi do abnormalnog rasta i razvoja i nezdravog stanja. Mnoge od tvari također su potrebne biljnim stanicama kao bitni međuprodukti ili metabolički katalizatori, ali netaknute biljke, za razliku od životinja, mogu proizvesti same sve što je potrebno. Međutim, u nekim čimbenicima može doći do nedostatka kultiviranih biljnih stanica i tkiva, kao što su rast i preživljavanje te se zatim poboljšavaju njihovim dodavanjem u kulturu tkiva. U ranijem radu zahtjevi kultura tkiva za količinama tragova određenih organskih tvari zadovoljeni su "nedefiniranim" dodacima, kao što su voćni sokovi, kokosovo mlijeko, ekstrakti kvasca ili slada i hidrolizirani kazein. Ti dodaci mogu doprinijeti vitaminima, aminokiselinama i regulatorima rasta u kulturi tkiva. Korištenje neodređenih dodataka smanjilo se jer je definirana potreba za određenim organskim spojevima, a one su u katalozima bile navedene kao čiste kemikalije (George, 2008.).



Slika 10. Niacin u biljkama

Izvor: http://www.tipdisease.com/2015/01/health-benefits-of-vitamin-b3-niacin.html

4.2. Razvoj vitaminskih mješavina

Vitamini koji se najčešće koriste u kulturi biljnog tkiva su tiamin (vitamin B1), nikotinska kiselina (niacin) i piridoksin (vitamin B6), te osim ovih triju spojeva, i mioinozitol. Prednost dodavanja tiamina otkrivena je gotovo istodobno (Bonner 1937., 1938.), Robbins i Bartley (1937.) i White (1937.). Pojavljuju se, osim tiamina, i nikotinska kiselina i piridoksin u medijima koje su objavili Bonner (1940.), Gautheret (1942.) i White (1943. b). Bonner i Devirian (1939.) otkrili su da nikotinska kiselina poboljšava rast izoliranih korijena rajčice, graška i rotkvica. Radovi Robbinsa i Schmidta (1939. a, b) pokazali su da piridoksin također poboljšava rast korijena rajčice. Ova četiri vitamina; mioinozitol, tiamin, nikotinska kiselina i piridoksin su sastojci hranjive podloge u kulturi tkiva po Murashige i Skoog (1962.) te se koriste u različitim omjerima za kulturu tkiva mnogih biljnih vrsta. Međutim, ako nije bilo istraživanja o zahtjevima određenog biljnog tkiva ili organa, nije moguće zaključiti da su svi vitamini koji su bili korišteni u određenom eksperimentu bili neophodni. Zahtjevi za dodane vitamine variraju ovisno o prirodi biljke i vrsti kulture. Welander (1977.) ustanovio je da Nitsch i Nitsch (1965.) vitamini nisu bili nužni, ili su bili čak i inhibitori izravnog pucanja peteljki begonije (*Begonia x hiemalis*). Roest i Bokelmann (1975.), s druge strane, dobili su povećanu formu pucanja na krizantemama *Chrysanthemum pedicels* kada su bili prisutni vitamini MS. Kalus od američkog borovca (*Pinus strobus*) najbolje je rastao kada je razina inozitola u MS hranjivoj podlozi smanjena na 50 mg/L, dok je vrijednost *Pinus echinata* najbrže proliferirao kada nije prisutan inozitol (Kaul i Kochbar, 1985.). Ishihara i Katano (1982.) otkrili su da se kultura jabuke (*Malus*) mogu uzgajati samo na MS podlozi, te da su inozitol i tiamin bili uglavnom nepotrebni.

4.3. Specifični spojevi – mioinozitol

Mioinozitol (također ponekad opisan kao mezo-inozitol ili i-inozitol) jedini je od devet teorijskih stereoizomera inozitola koji ima značajan biološki značaj. Medicinski je klasificiran kao član kompleksa vitamina B i potreban je za rast kvasca i mnogih stanica sisavaca u kulturi tkiva. Štakori i miševi ga zahtijevaju za rast dlake i može dovesti do dermatitisa kada nije uključen u prehranu. Mioinozitol je klasificiran kao biljni 'vitamin',

ali treba napomenuti da neki autori navode da se treba smatrati dodatnim ugljikohidratima, iako ne doprinosi upotrebi ugljikohidrata kao izvorom energije.

4.4. Povijesna uporaba u kulturi tkiva

Mioinozitol je prvi put prikazao Jacquiot (1951.), koji je pogodovao oblikovanju pupoljaka kardijalnim tkivom kada se primjenjuje na 20 - 1000 mg/L. Nekroza je bila usporena, iako se proliferacija kalusa nije promicala. Moron i Wetmore (1951.) također su koristili mio-inositol na 100 mg/L u kombinaciji sa šest drugih vitamina za kulturu kalusa iz monokotiledona biljke *Amorphophallus rivieri.* Vitamin je usvojio i Wood i Braun (1961.) i Murashige i Skoog (1962.) u kombinaciji s tiaminom, nikotinskom kiselinom i piridoksinom u njihovim kulturama tkiva biljaka *Catharanthus roseus* i *Nicotiana tabacum*.

4.5. Tiamin

Tiamin (vitamin B1, aneurin) u obliku tiamin pirofosfata bitan je kofaktor u metabolizmu ugljikohidrata i izravno je uključen u biosintezu nekih aminokiselina. Dodavan je češće nego bilo koji drugi vitamin. Tkiva većine biljaka, čini se da ga zahtijevaju za rast, a potreba postaje vidljivija uz uzastopne prolaze, ali neke kultivirane stanice su samo dostatne. Polikarpochkina i sur. (1979.) pokazali su da kultura kukuruza ima znatno manji rast u prolazu 2 i ugiba u trećem prolazu kada je tiamin izostavljen iz kulture tkiva. MS hranjiva podloga sadrži 0,3 uM tiamina. Asano i sur. (1996.) ističu da je tiamin najvažniji za stimuliranje embriogene indukcije kalusa u biljke *Zoysia japonica* iz Japana. Digby i Skoog (1966.) otkrili su da normalne kalusne kulture duhana proizvode odgovarajuću količinu tiamina za potporu rastu, što daje relativno visoku razinu kinetina (oko 1 mg/L) koji je dodan u hranjivu podlogu.

4.6. Ostali vitamini

4.6.1. Pantotenska kiselina

Pantotenska kiselina igra važnu ulogu u rastu određenih tkiva. Koristi se za proizvodnju kalusa stabljike gloga (Morel, 1946.) i stimuliraju proliferaciju tkiva u vrbi i crnoj buniki

(Telle i Gautheret, 1947.; Gautheret, 1948.). Međutim, pantotenska kiselina nije pokazala učinke s tkivom mrkve, vinove loze i virginije koji su ga sintetizirali u značajnim količinama (oko 1 µg/mL).

4.6.2. Vitamin C

Vitamin C (Slika 11.) se još naziva i askorbinska kiselina. Spoj se također upotrebljava za vrijeme eksplantacije i za sprječavanje zamračivanja. Osim toga, njegova uloga kao antioksidansa, askorbinska kiselina je uključena u podjelu stanica i produživanje, npr. u stanicama duhana kako je opisao De Pinto i sur. (1999.). Askorbinska kiselina (4 - 8 x 10 - 4 M) također je pojačala formaciju mladog i starog duhanskog kalusa (Joy i sur., 1988.).



Slika 11. Vitamin C

Izvor: http://www.artesanias-minerales.com/vitamin-c/

4.6.3. Vitamin D

Vitamin D (kalciferol) otkriven je 1922. godine. Neki vitamini u skupini D, posebice vitamini D2 i D3, mogu imati regulatorni učinak rasta na kulturama biljnih tkiva. Vitamin D povećava proizvodnju proteina koji veže kalcij u stanicama. Vitamin D3 igra važnu ulogu u regulaciji kalcija u stabljici što je vrlo važno u vegetativnom razmnožavanju, pospješuje aktivnost rasta biljnih tkiva te poboljšava rast korijena u stresnim uvjetima. Također djeluje na stvaranje hormona kao i enzima potrebnih za proces fotosinteze. Feuer

(2012.) u svom istraživanju navodi da biljke zalijevane vitaminom D rastu brže od biljaka zalijevanih vodom te da su izgledom zdravije, s većim izdancima i plojkama, manje podložne utjecaju štetnika i raznim biljnim bolestima. Schmid i Buchala (1987.) proučavali su utjecaj vitamina D na rast korijena topole te na klijanje salate. Dokazali su da bočni korijeni topole rastu brže, a salata je proklijala čak i u odsustvu svjetlosti.

4.6.4. Vitamin E

Vitamin E, odnosno (alfa) α - tokoferol, najaktivniji je oblik vitamina E iz porodice tokoferola. On je liposolubilan, tj. u masti topiv vitamin. Primarna i glavna uloga vitamina E je antioksidativna, u prevenciji nastanka slobodnih radikala i reaktivnih vrsta kisika. Lunn (2015.) navodi ako se vitamin E primjeni zelenom ljiljanu (*Chlorophytum comosum*) tada će ova biljka pokazati veću stopu rasta.

4.6.5. Folna kiselina i riboflavin

Dokazano je da folna kiselina usporava proliferaciju tkiva u mraku, dok ga povećava u svjetlu. To je vjerojatno zato što se hidrolizira u svjetlu do p – aminobenzojeve kiseline (PAB). U prisutnosti auksina, pokazalo se da PAB ima slab stimulacijski učinak na uzgoj biljnih tkiva (De Capite, 1952. a, b). Riboflavin koji je sastavni dio nekih vitaminskih smjesa, dokazano je da inhibira stvaranje kalusa, ali može poboljšati rast i kvalitetu izbojaka (Drew i Smith, 1986.). Pokazalo se da riboflavin stimulira korijenje na izbojke biljke *Carica papaya* (Drew i sur., 1993.), jabuka (Van der Krieken i sur., 1992.) i *Eucalyptus globulus* (Trindade i Pais, 1997.). Također poboljšava indukciju kalusa u biljke *Zoysia japonica* u kombinaciji s citokinima i tiaminom (Asano i sur., 1996.).

4.7. Ekstrakt kvasca

Ekstrakt kvasca danas se upotrebljava manje više kao sastojak hranjive podloge nego u prošlim vremenima kada je dodan kao izvor aminokiselina i vitamina, posebno inozitol i tiamin (vitamin B1) (Bonner i Addicott, l937.; Robbins i Bartley, 1937.). White, (1934.), te Robbins i Bartley (1937.) tvrde da je ekstrakt kvasca bitan za rast tkiva. Ubrzo je ustanovljeno da aminokiseline poput glicina, lizina i arginina, kao i vitamini poput tiamina

i nikotinske kiseline mogu poslužiti kao zamjena za ekstrakt kvasca, na primjer u rastu korijena rajčice (Skinner i Street, 1954.) ili šećerne trske (Nickell i Maretzki, 1969.). Postotak aminokiselina u tipičnom ekstraktu kvasca je visok (npr. 7% amino dušika (Nickell i Maretzki, 1969.; Bridson, 1978.; Thom i sur., 1981.), ali ima manje glutaminske kiseline nego u kazeinu ili drugim hidroliziranim proteinima. Ekstrakt kvasca obično se dodaje u hranjivu podlogu u koncentracijama od 0,1 - 1 g/L, a povremeno 5, 10 i čak 20 g/L (Morel i Muller, 1964.).

4.8. Ekstrakt od krumpira

Radnici u Kini otkrili su da je došlo do značajnog porasta broja peludnih zrnaca iz prašnika pšenice kada su uzgojeni na hranjivoj podlozi od agara koji sadrži samo ekstrakt kuhanog krumpira, 0.1 mM FeEDTA, 9% saharoze i regulatore rasta. Utvrđeno je da je hranjiva podloga od ekstrakta krumpira bolja za prašnike proljetne pšenice od sintetičke podloge (McGregor i McHughen, 1990.). Nismo ni svjesni činjenice da se ekstrakt krumpira dodaje hranivoj podlozi za mikropropagaciju, osim povremenih izvješća o njegovoj upotrebi za razmnožavanje orhideja. Zanimljivo je otkriće da je ekstrakt od krumpira omogućio u *in vitro* uzgoju orhideje (*Doritaenopsis*) da se oporave od hiperhidričnosti (Zou, 1995.).

4.9. Ekstrakt slada

Iako se više ne koristi, ekstrakt slada igra određenu ulogu u kulturama *Citrus*. Ekstrakt slada, uglavnom izvor ugljikohidrata, pokazao je da pokreće embriogenezu (Rangan i sur., 1968.; Rangan, 1984.). Nekoliko zadnjih istraživanja pokazalo je ulogu ekstrakta slada u razmnožavanju somatskih embrija *Citrus sinensis* (Das i sur., 1995.), te u drugim *Citrus* spp. (Jumin, 1995.), u promicanju formiranja biljaka iz somatskih embrija dobivenih iz različitih vrsta citrusa (De Pasquale i sur., 1994.). Ekstrakt je komercijalno dostupan i koristi se na razini od 0,5 - 1 g/L.

4.10. Homogenat od banane

Homogenizirani plod banana ponekad se dodaje hranjivim podlogama za uzgoj kultura orhideja i često se navodi da promoviraju rast. Razlog njegovog stimulacijskog učinka nije objašnjen. Jedan prijedlog spomenut ranije je da bi moglo pomoći u stabilizaciji pH hranjive podloge. Pierik i sur. (1988.) utvrdili su da je homogenat od banane blago inhibirao klijanje orhideja (*Paphiopedilum ciliolare*), ali je i promicao rast sadnica nakon što je klijanje prošlo.

4.11. Kokosovo mlijeko / voda

Kada se dodaju u hranjivu podlogu koji sadrži auksin, tekući endosperm ploda kokosove palme (*Cocos nucifera*) (Slika 12.) može potaknuti biljne stanice da se podijele i rastu brzo. Tekućina se najčešće naziva kokosovim mlijekom, iako Tulecke i sur. (1961.) tvrde da je točan engleski izraz „kokosova voda“. Van Overbeek i sur. (1941., 1942.) otkrili su da je dodavanje kokosovog mlijeka hranjivoj podlozi nužno za razvoj vrlo mladih embrija biljke bijelog kužnjaka (*Datura stramonioum*). Burnet i Ibrahim (1973.) su utvrdili da je 20% kokosovog mlijeka (tj. jedna petina konačnog volumena podloge) bilo potrebno za inicijaciju i nastavak rasta tkiva raznih vrsta *Citrus* u hranjivoj podlozi MS. Rangan (1974.) je dobio poboljšani rast prosa (*Panicum miliaceum*) u MS hranjivoj podlozi korištenjem 2,4 - D u prisutnosti 15% kokosovog mlijeka. Međutim, dodavanje kokosovog mlijeka u hranjive podloge često daje jednostavan način za postizanje zadovoljavajućeg rasta ili morfogeneze bez potrebe za izradom odgovarajuće definirane formulacije.



Slika 12. Kokos i kokosovo mlijeko

Izvor: http://www.cancerhealthcoach.ca/blog/coconut-milk-add-rich-tropical-goodness-to-your-everyday-life

5. Organske kiseline

Organske kiseline mogu imati tri uloge u kulturi biljnog tkiva:

- mogu djelovati kao kelati, poboljšavajući dostupnost nekih mikronutrijenata
- mogu djelovati kao pufer u hranjivoj podlozi kako ne bi došlo do promjene pH,
- mogu djelovati kao hranjive tvari.

Dougall i sur. (1979.) utvrdili su da 20 mM sukcinata, malata ili fumarata utječu na maksimalni rast stanica divlje mrkve kada je podloga početno podešena na pH 4,5.

5.1. Upotreba kao puferi

Dodavanje organskih kiselina na hranjive podloge nije nedavna spoznaja. Mnogi autori su utvrdili da su neke organske kiseline i njihove natrijeve ili kalijeve soli stabiliziraju pH hidroponskih otopina (Trelease i Trelease, 1933.) ili *in vitro* hranjivih podloga (Van Overbeek i sur., 1941., 1942.; Arnow i sur., 1953.), iako se mora priznati da oni nisu učinkoviti kao sintetički biološki puferi. Norstog i Smith (1963.) otkrili su da 100 mg/L jabučne kiseline djeluje kao djelotvorno pufersko sredstvo u hranjivoj podlozi za kulture zrna ječma i također se čini da se poboljšava rast u prisutnosti glutamina i alanina.



Slika 13. Limunska kiselina

Izvor: http://cooking.lovetoknow.com/where-buy-citric-acid

Kiseline su, dakako djelotvorni puferi između pH 5 i pH 6, ali autoklavirajući hranjivu podlogu koja sadrži natrijev citrat ili limunsku kiselinu dovodi do znatanog porasta pH vrijednosti. Organske kiseline kao što su limunska, maleinska, jabučna i malonska (ovisno o vrsti) nalaze se u ksilenskom soku biljaka, gdje se zajedno s aminokiselinama mogu povezati s metalnim ionima i pomoći im u transportu (White i sur., 1981.). Dodavajući organske kiseline Krebsovog ciklusa hranjivoj podlozi poboljšava se metabolizam NH_4^+. Kulture ne podnose dodavanje velike količine slobodnih kiselina koje će samo zakiseliti hranjivu podlogu.

Čini se da neke biljke dobivaju prehrambenu korist prisustvom jedne posebne organske kiseline. Murashige i Tucker (1969.) dokazali su da narančin sok dodan hranjivoj podlozi koji sadrži MS soli potiče rast kalusa agruma (*Citrus* spp.). Jabučna i druge kiseline Krebsovog ciklusa također imaju slične efekte; od tih, limunska kiselina (Slika 13.) proizvodi najizraženije stimulacije rasta. Dodavanje L - jabučne kiseline (Slika 14.) u hranjivu podlogu (Savage i sur. 1979.) znatno se poboljšala stopa opstanka i snage malih kaktusa.



Slika 14. L – jabučna kiselina u pakiranju

Izvor: https://purebulk.com/l-malic-acid-powder/

6. Šećeri – nutritivni i regulacijski učinci

Ugljikohidrati igraju važnu ulogu u *in vitro* kulturi kao izvor energije i ugljika, kao i osmotsko sredstvo. Nema dokaza da je uloga ugljikohidrata važna u normalnim uvjetima rasta i razvoja stanica kulture.

6.1. Alternative saharoze

Izbor saharoze kao najprikladniji izvor energije za kulture prati mnoge usporedbe između mogućih alternativa. Neki od prvih radova ove vrste je učinjeno od strane Gauthereta (1945.) koristeći normalno tkivo mrkve. Pronađeno je da je saharoza najbolji izvor ugljika, a slijedi ga glukoza, maltoza i rafinoza. Fruktoza je bila manje učinkovita, a manoza i laktoza bili su najmanje pogodni (George, 2008.). Umnožavanje biljaka *Alnus crispa*, *A. cordata* i *A. rubra* istraživanje je pokazalo da je bilo najbolje na glukozi, dok je *A. glutinosa* bio najbolji na saharozi (Tremblay i Lalonde, 1984.; Tremblay i sur., 1984.; Barghchi, 1988.).

6.2. Maltoza

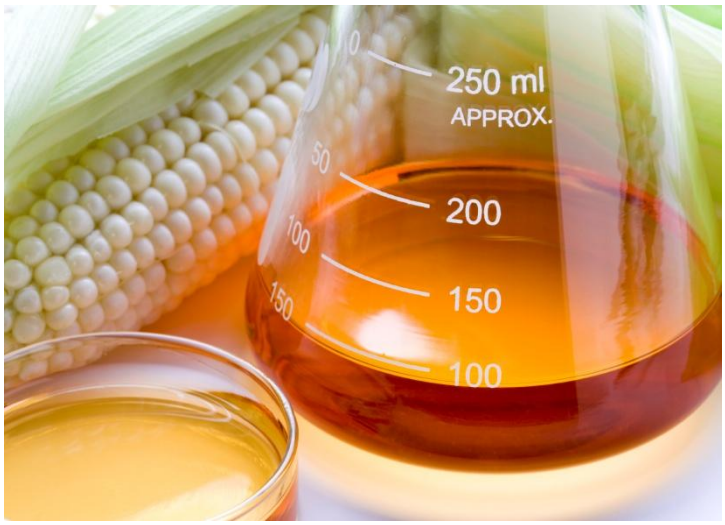
Maltoza (sladni šećer) je disaharid koji nastaje hidrolitičkom razgradnjom škoba pomoću enzima amilaze. Nalazi se u proklijalim sjemenima žitarica. Ima je u pivu, tjestenini i krumpiru. Gautheret (1945.) je svojom pokusima mogao uzgojiti mrkvu na maltozi. Mathes i sur. (1973.) dobili su samo minimalan rast tkiva javora (*Acer*) na podlozi na kojoj se nalazila maltoza. Kasnije su istraživanja dala više istaknutu ulogu maltoze kao komponente hranjive podloge u kulturi tkiva. Maltoza je dovela do znatnog porasta somatskih embrija iz petunije (*Petunia anthers*) (Raquin, 1983.). Maltoza je također povećala indukciju kalusa u riži (Xie i sur., 1995.). Zabilježeno je da je maltoza jednaka ili nadmašuje saharozu u podržavanju embriogeneze u brojnim vrstama, uključujući mrkvu (Verma i Dougall, 1977.; Kinnersley i Henderson, 1988.), lucerne (Strickland i sur., 1987.), divlja trešnja (Reidiboym-Talleux i sur., 1999.) i dr. Maltoza je dovela do znatno veće stope klijavosti somatskih embrija šparoga (*Asparagus*) nego saharoza (Kunitake i sur., 1997.).

6.3. Laktoza

Laktoza ili mliječni šećer nalazi se u mlijeku sisavaca. Kada se dodao u hranjivu podlogu, otkriveno je da inducira aktivnost enzima β - galaktozidaze koji se može izlučiti u hranjivu podlogu. Hidroliza laktoze do galaktoze i glukoze dopušta rast kalusa biljke nemesije (*Nemesia strumosa*) i petunije (*Petunia hybrida*) (Hess i sur., 1979.; Callebaut i Motte, 1988.). Mitchell i sur. (1980.) i Rodriguez i Lorenzo Martin (1987.) utvrdili su da dodavanje 30 g/L laktoze u MS hranjivu podlogu umjesto saharoze povećava broj izbojaka koje proizvodi patuljasta banana (*Musa accuminata)*.

6.4. Kukuruzni sirup

Kinnersley i Henderson (1988.) pokazali su da se određeni kukuruzni sirupi (Slika 15.) mogu koristiti kao izvor ugljika u hranjivim podlogama i da oni mogu izazvati morfogenezu koju se ne izaziva nadopunjavajući saharozom.



Slika 15. Kukuruzni sirup

Izvor: https://oukosher.org/blog/industrial-kosher/high-fructose-corn-syrup/

6.5. Neuobičajeni šećeri

U nekim biljkama neuobičajeni šećeri mogu regulirati morfogenezu i diferencijaciju. Galaktoza stimulira embriogenezu u kulturama *Citrus* (Kochba i sur., 1978.) i može poboljšati sazrijevanje embrija lucerne. Kalus krastavca (*Cucumis sativus*) je najbrže rastao na rafinozi i bio je sposoban formirati korijene kada se uzgajao na ovom šećeru; somatski embriji su bili diferencirani samo kada je kalus bio uzgojen na saharozi (88 - 175 mM), ali ako je u 88 mM saharoze dodana manja količina stahioze (0.3 mM), kalus je producirao adventivne izbojke (Kim i Janick, 1989.).

6.6. Šećerni alkoholi

Šećerni alkoholi ili polioli su ugljikohidrati koji se prirodno nalaze u određenom voću i povrću, ali mogu biti i sintetizirani. Iako nose naziv alkoholi, ne sadrže etanol. Smatra se da šećerni alkoholi obično nisu metabolizirani u biljnim tkivima i stoga nisu dostupni kao izvori ugljika. Zbog toga su manitol i sorbitol često korišteni kao osmotika za izmjenu vodenog potencijala hranjive podloge. Otkriveno je da je manitol metaboliziran u tkivima *Fraxinus* (Wolter i Skoog, 1966.).

7. Biljni hormoni

Sve biljke prirodno sadrže kemijske supstance koje pozitivno utječu na njihov rast i razvoj. U regulatore rasta, koji su odgovorni za procese rasta i razvitka, ubrajaju se auksini, citokinini i giberelini, te apscizinska kiselina (ABA) i etilen koji je jedini plinoviti hormon.

7.1. Auksini

Među biljnim hormonima prvi su otkriveni auksini. Oni djeluju tako da omogućuju rastezanje stanične stjenke. Stimuliraju sintezu tvari potrebnih za rast stanične stijenke. Ta dva procesa omogućuju produžni rast stanica. Djeluju na sekundarni rast potičući diobu stanica, potiču stvaranje adventivnog korijenja, stimuliraju rast plodova, inhibiraju stanične diobe u bočnim pupovima.

7.2. Giberelini

Sintetiziraju se u mladim listovima i korijenju te u embrijima. Stimuliraju rast listova i stabljike, ali imaju vrlo slab učinak na rast korijena. Giberelinima se često može prekinuti period dormancije sjemenki i pupova, te potaknuti klijanje sjemenki žitarica. U sjemenkama žitarica giberelini stimuliraju sintezu probavnih enzima, odnosno enzima koji razgrađuju pričuvni škrob. U kulturi *in vitro* najčešće se koristi hormon GA3.

7.3. Citokinini

Citokinini stimuliraju diobu stanica. Sintetiziraju se u tkivima koja aktivno rastu kao što su vrškovi korijena, embriji i plodovi. Djeluju na odgađanje starenja u odvojenim organima, mobilizaciju hranjivih tvari, sazrijevanje kloroplasta i sudjelovanje u kontroli apikalne dominacije. Neke bakterije također stvaraju i izlučuju znatne količine citokinina ili djeluju na biljne stanice tako da ih potiču na proizvodnju citokinina. Scoog je 1955. godine uzgajao stanice duhana na sintetičkoj podlozi koja je sadržavala mineralne soli, šećere, vitamine i auksin. Kada je u podlogu dodao kokosovo mlijeko stanice su se počele dijeliti i umnožavati, a prije toga nije bilo diobe.

7.4. Apscizinska kiselina

Apscizinska kiselina, kao i etilen, kontrolira procese karakteristične za završne razvojne studije biljaka (starenje, otpadanje listova, venuće cvjetova, dozrijevanje plodova). Osim toga, oba ova hormona kontroliraju stopu rasta u nepovoljnim uvjetima inhibirajući rast, sintezu bjelančevina i transport iona. ABA se sintetizira u stanicama koje sadržavaju kloroplaste ili amiloplaste. Ona u biljkama uzrokuje različite fiziološke učinke, među kojima su najvažniji indukcija dormancije pupova (razdoblje mirovanja) i sjemenki te zatvaranje puči. ABA se naziva i hormonom stresa jer regulira vodnu ravnotežu biljaka u uvjetima nedostatka vode uzrokujući zatvaranje puči (smanjenje gubitka vode transpiracijom) i povećavajući primanje vode korijenom.

8. Ostali sastojci – sredstva za skrućivanje

Ako se u tekuću hranjivu podlogu dodaju agar - agar ili želatina dobiju se krute hranjive podloge.

8.1. Agar – agar

Agar – agar je komponenta za skrutnjavanje koja se sastoji od polisaharida s visokom relativnom molekularnom masom (Mr). Dobiva se ekstrakcijom iz crvenih morskih algi. Dodatkom agar - agara iz tekućih podloga dobivamo krute. Otapa se na 98°C, a skrutnjava na 43 - 45°C.

8.2. Želatina

Želatina je komponenta za skrutnjavanje bjelančevinastog sastava. Manje je pogodna od agar - agara jer se otapa na 30°C, skrutnjava na 20 - 22°C.

8.3. Pektin

Mješavina pektina i agara može biti jeftiniji nadomjestak za agar. Na primjer, polukruta podloga koja se sastojala od 0,2 % agara i 0,8 - 1,0 % pektina, upotrijebljena je za uzgoj kultura jagoda i nekih drugih biljaka (Zimmerman, 1979.).

9. Zaključak

Kultura biljnih tkiva i stanica *in vitro* vrlo je zanimljiva metoda vegetativnog razmnožavanja bilja. U laboratoriju za mikropropagaciju ili mikrorazmnožavanje umnožavaju se biljke na sterilnim hranjivim podlogama u staklenkama ili ponekad u epruvetama. Bitno je naglasiti da se kemijski sastav hranjive podloge razlikuje ovisno o biljnoj vrsti. Svaka hranjiva podloga mora sadržavati u pravilu, makro i mikroelemente, organske tvari, vitamine, biljne hormone, agar, pufere i dr. Omjer biljnih hormona vrlo je bitan jer utječe na formiranje i razvoj stanica izdanaka, korijena ili kalusnog tkiva. Hranjiva podloga za razmnožavanje sadrži hormon citokinin koji je bitan za stvaranje postranih pupova. Svaka hranjiva podloga mora biti sterilna. Sterilizacija hranjive podloge se može vršiti na više načina: fizičkim uništavanjem mikroorganizama suhim vrućim zrakom, vrelom parom (autoklav) ili zračenjem (UV svjetlom ili g - zračenjem), kemijskim uništavanjem mikroorganizama pomoću različitih preparata. Najčešće se u nas podloge steriliziraju u autoklavu na 120°C, 20 minuta. Vrlo često dolazi do kontaminacije hranjive podloge, a do toga može doći iz više razloga, a najčešći su zbog nedjelotvornih metoda prilikom sterilizacije eksplatanata uzetih s biljke *in vivo*, određivanja zagađivača u biljnoj kulturi *in vitro*, rukovanja aseptičnim biljnim materijalom te sterilizacije posuda za kultiviranje, instrumenata i hranjive podloge.

10. Popis literature

1. Adatia, M. H., Besford, R. T. (1986.): The effect of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. Ann. Bot., 58: 343-351.

2. Arnon, D. I., Stout, P. R. (1939): Molybdenum as an essential element for higher plants. Plant Physiol., 14: 599-602.

3. Arnow, P., Oleson, J.J., Williams, J.H. (1953.): The effect of arginine in the nutrition of *Chlorella vulgaris*. Am. J. Bot., 40: 100-104.

4. Asano, Y., Katsumoto, H., Inokuma, C., Kaneko, S., Ito Y., Fujiie, A. (1996.): Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α-ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica*. Steud. J. Plant Physiol., 149: 413-417.

5. Barghchi, M. (1988.): Micropropagation of *Alnus cordata* (Loisel.) Loisel. Plant Cell Tissue Organ Cult., 15: 233-244.

6. Bister-Miel, F., Guignard, J.-L., Bury, M., Agier, C. (1985.): Glutamine as an active component of casein hydrolysate: its balancing effect on plant cells cultured in phosphorus deficient medium. Plant Cell Rep., 4: 161-163.

7. Bobtelsky, M., Jordan, J. (1945.): The metallic complexes of tartrates and citrates, their structure and behavior in dilute solutions. I. The cupric and nickelous complexes. J. Am. Chem. Soc., 67: 1824-1831.

8. Bonner, J. (1937.): Vitamin B1, a growth factor for higher plants. Science, 85: 183-184.

9. Bonner, J. (1938. a): Thiamin (Vitamin B1) and the growth of roots: the relation of chemical structure to physiological activity. Am. J. Bot., 25: 543-549.

10. Bonner, J. (1940. a): Specificity of nicotinic acid as a growth factor for isolated pea roots. Plant Physiol., 15: 553-557.

11. Bonner, J., Devirian, P.S. (1939.): Growth factor requirements of four species of isolated roots. Am. J. Bot., 26: 661-665.

12. Bonner, J., Addicott, F. (1937.): Cultivation *in vitro* of excised pea roots. Bot. Gaz., 99: 144-170.

13. Bourgin, J.-P., Nitsch, J. P. (1967.): Production of haploid *Nicotiana* from excised stamens. Ann. Physiol. Veg., 9: 377- 382.

14. Bowen, J. E. (1979.): Boron essentiality and transport in suspension cultured sugarcane cells. Plant Physiol. 63, Suppl., 163.

15. Brewbaker, J. L., Kwack, B. H. (1963.): The essential role of calcium ion in pollen

germination and pollen tube growth. Am.J. Bot., 50: 859-865.

16. Bridson, E.Y. (1978.): Diets, culture media and food supplements. pp. 91-281 in 17. Rechcigl M. Jr. (ed.) *CRC Handbook Series in Nutrition and Food*. Section G. Vol.3.

17. Brownell, P. F. (1979.): Sodium as an essential micronutrient element for plants and its possible role in metabolism. Adv. Bot. Res., 7: 117-224.

18. Broyer, T. C., Carlton, A. B., Johnson, C. M., Stout, P. R. (1954.): Chlorine - a micronutrient element for higher plants. Plant Physiol., 29: 526-532.

19. Burnet, G., Ibrahim, R.K. (1973.): Tissue culture of *Citrus* peel and its potential for flavonoid synthesis. Z. Pflanzenphysiol., 69: 152-162.

20. Callebaut, A., Motte, J.-C. (1988.): Growth of cucumber cells in media with lactose or milk whey as carbon source. Plant Cell Rep., 7: 162- 165.

21. Chin, C., Miller, D. (1982.): Some characteristics of the phosphate uptake by *Petunia* cells. HortScience, 17: 488.

22. Clarkson, D. T., Hanson, J. B. (1980.): The mineral nutrition of higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 31: 239-298.

23. Dalton, C. C., Iqbal, K., Turner, D. A. (1983.): Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. Physiol. Plant., 57: 472-476.

24. Das, T., Mitra, G.C., Chatterjee, A. (1995.): Micropropagation of *Citrus sinensis* var. mosambi: an important scion. Phytomorph, 45: 57-64.

25. De Capite, L. (1952. a): Combined action of p-aminobenzoic acid and indoleacetic acid on the vascular parenchyma of Jerusalem artichoke cultured *in vitro*. Compt. Rend. Soc. Biol., 146: 863-865.

26. De Capite, L. (1952. b): Action of p-aminophenylsulphonamide and p-amino-benzoic acid on the vascular parenchyma of Jerusalem artichoke and of crown-gall tissue of salsify. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 234: 2478-2480.

27. De Pasquale, F., Carimi F., Crescimanno, F.G. (1994.): Somatic embryogenesis from styles of different cultivars of *Citrus limon* (L.) Burm. Aust. J. Bot., 42: 587-594.

28. De Pinto, M.C., Francis, D., De Gara, D. (1999.): The redox state of the ascorbate-dehydroascrobate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. Protoplasma, 209: 90-97.

29. Dencso, I. (1987.): Factors influencing vitrification of carnation and conifers. Acta Hortic, 212: 167-176.

30. Devlin, R.M. (1975.): *Plant Physiology*. 3rd. Edition. Van Nostrand Reinhold Co., New York.

31. Digby, J., Skoog, F. (1966.): Cytokinin activation of thiamine biosynthesis in tobacco callus cultures. Plant Physiol., 41: 647-652.

32. Doerschug, M. R., Miller, C. O. (1967.): Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants. Am. J. Bot., 54: 410-413.

33. Dougall, D.K., Weyrauch, K.W., Alton, W. (1979.): The effects of organic acids on growth and anthocyanin production by wild carrot cells growing on ammonia as a sole nitrogen source. In Vitro, 15: 189-190 (Abst. 103).

34. Drew, R.A., Smith, N.G. (1986.): Growth of apical and lateral buds of pawpaw (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. J. Hortic. Sci., 61: 535-543.

35. Drew, R.A., Mccomb, J.A., Considine, J.A. (1993.): Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. *in vitro* in relation to auxin sensitive phases and use of riboflavin. Plant Cell Tissue Organ Cult., 33: 1-7.

36. Durzan, D. J. (1987.): Ammonia: Its analogues, metabolic products and site of action in somatic embryogenesis. pp. 92-136 in Bonga, J.M. and Durzan, D.J (eds.) *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol. 2. *Specific Principles and Methods: Growth and Develop-ment.* Martinus, Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. ISBN 90-247-3431-2

37. Eeuwens, C.J. (1976.): Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. Physiol. Plant., 36: 23-28.

38. Eltinge, E. T., Reed, H. S. (1940.): The effect of zinc deficiency upon the root of *Lycopersicon esculentum*. Am. J. Bot., 27: 331-335.

39. Eriksson, T. (1965.): Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Happlopapus gracilis*. Physiol. Plant., 18: 976-993.

40. Faye, M., David, A., Lamant, A. (1986.): Nitrate reductase activity and nitrate accumulation in *in vitro* produced axillary shoots, plantlets and seedlings of *Pinus pinaster*. Plant Cell Rep., 5: 368-371.

41. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968.): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50: 151-158.

42. Gautheret, R.J. (1942.): *Manuel Technique de Culture des Tissue Végétaux*. Masson et Cie, Paris.

43. Gautheret, R.J. (1945.): Une voie nouvelle en biologie végétale: la culture des tissus. Gallimard, Paris.

44. Gautheret, R.J. (1948.): Sur la culture indéfinie des tissus de *Salix caprea*. Compt. Rend. Soc. Biol., 142, 807.

45. Gautheret, R. J. (1939.): Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus tubercule de carotte. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 208, 118.

46. George, E. F., (2008.): Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, 65–113

47. George, E. F., (2008.): Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, 115–173.

48. George, E. F., Puttock, D. J. M., George, H. J. (1987.): *Plant Culture Media Vol.1*. Exegetics Ltd., Westbury, England.

49. Gerendás, J., Polacco, J. C., Freyeremuth, S. K., Sattelmacher, B. (1999.): Signifcance of nickel for plant growth and metabolism. J. Plant Nutr. Soil Sc., 162: 241-256.

50. Glasstone, V. F. C. (1947.): Inorganic micronutrients in tomato root tissue culture. Am. J. Bot., 34: 218-224.

51. Grimes, H. D., Hodges, T. K. (1990.): The inorganic NO_3^-–NH_4^+ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of Indica rice (*Oryza sativa* L.). J. Plant Physiol., 136: 362-367.

52. Hahlbrock, K. (1974.): Correlation between nitrate uptake, growth and changes in metabolic activities of cultured plant cells. p. 363 in Street H.E. (ed.) *Tissue Culture and Plant Science.* Academic Press, London, New York, San Francisco.

53. Hess D., Leipoldt, G., Illg, R.D. (1979.): Investigations on the lactose induction of β-galactosides activity in callus tissue cultures of *Nemesia strumosa* and *Petunia hybrida*. Z. Pflanzenphysiol., 94: 45-53.

54. Hewitt, E. J. (1948.): Relation of manganese and some other metals to the iron status of plants. Nature, 161, 489.

55. Holm-Hansen, O., Gerloff, G. C., Skoog, F. (1954.): Cobalt as an essential element for blue-green algae. Physiol. Plant., 7: 665-675.

56. Hossain, B., Hirata, N., Nagatomo, Y., AkashI, R., Takaki, H. (1997.): Internal zinc accumulation is correlated with increased growth in rice suspension culture. J. Plant Growth Regul., 16: 239-243.

57. Hunault, G. (1985.): Organic acids, pH, ammonium and nitrate interactions on the growth of *Asparagus* tissues cultivated *in vitro*. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg., 13: 63-75.

58. Ishihara, A., Katano, M. (1982.): Propagation of apple cultivars and rootstocks by shoot-tip culture. pp. 733-734 in Fujiwara A. (ed.) 1982 (q.v.).

59. Jacobson, L. (1951.): Maintenance of iron supply in nutrient solutions by a single addition of ferric potassium ethylene-diamine tetra-acetate. Plant Physiol., 26: 411-413

60. Jacobson, L., Cooper, B. R., Volz, M. G. (1971.): The interaction of pH and aeration in Cl uptake by barley roots. Physiol. Plant., 25: 432-435.

61. Jacquiot, C. (1951.): Action of meso-inositol and of adenine on bud formation in the cambium tissue of *Ulmus campestris* cultivated *in vitro*. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 233: 815-817.

62. Jarvis, S. C. (1984.): The effects of nitrogen supply on the absorption and distribution of copper in Red clover (*Trifolium pratense* L.) grown in flowing solution with a low, maintained concentration of copper. Ann. Bot., 53: 153-161.

63. Johnson, C. M., Stout, P. R., Broyer, T. C., Carlton, A. B. (1957.): Comparative chlorine requirements of different plant species. Plant Soil, 8: 337-353.

64. Jordan, D. B., Fletcher, J. S. (1979.): The relationship between NO_2^- accumulation, nitrate reductase and nitrite reductase in suspension cultures of Paul's Scarlet rose. Plant Sci. Lett., 17: 95-99.

65. Joy, IV R.W., Patel, K.R., Thorpe, T.A. (1988.): Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco. Plant Cell Tissue Organ Cult., 13: 219-228.

66. Jumin, H.B. (1995.): Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Citrus* and its relatives. Phytomorphology, 45: 1-8.

67. Kaul, K., Kochhar, T.S. (1985.): Growth and differentiation of callus cultures of *Pinus*. Plant Cell Rep., 4: 180-183.

68. Kim, Y.-H., Janick, J. (1989. b): Somatic embryogenesis and organogenesis in cucumber. HortScience, 24: 702.

69. King, P. J. (1977.): Studies on the growth in culture of plant cells, growth limitiation by nitrate and glucose in a chemostat culture of *Acer pseudoplatanus*. J. Exp. Bot., 28: 142-155.

70. Kinnersley, A.M., Henderson, W.E. (1988.): Alternative carbohydrates promote differentiation of plant cells. Plant Cell Tissue Organ Cult., 15: 17-22.

71. Kintzios, S., Stavropopoulou, E. R., Skamneli, S. (2004.): Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of *in vitro* dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). Plant Sci., 167: 655-664.

72. Kirby, E. G., Leustek, T., Lee, M. S. (1987.): Nitrogen nutrition. pp. 67-88 in Bonga and Durzan (eds.) *Cell and Tissue Culture in Forestry* Vol 1. *General Principles and Biotech-nology*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. ISBN 90-247-3430-4.

73. Knudson, L. (1922.): Non-symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz., 73: 1-25.
74. Kochba, J., Spiegel-Roy, P., Saad, S., Neumann, H. (1978.): Stimulation of embryogenesis in *Citrus* tissue culture by galactose. Naturwissenschaften, 65: 261-262.
75. Kunitake, H., Nakashima, T., Mori, K., Tanaka, M. (1997.): Normalization of asparagus somatic embryogenesis using a maltose-containing medium. J. Plant Physiol., 150: 458-461.
76. Lamotte, C. E., Lersten, N. R. (1971.): An attempt to induce bacteria -free plants of *Psychotria punctata* (Rubiaceae) in tissue culture. Am. J. Bot., 58: 476.
77. Leiffert, C., Murphy, K. P., Lumsden, P. J. (1995.): Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. Crit. Rev. Plant Sci., 14: 83-109
78. Loreti, F., Morini, S., Concetti, S. (1988.): Effect of potassium and nitrogen concentration on growth of peach shoots cultured *in vitro*. Acta Hortic., 227: 311-317.
79. Maccarthy, J. J., Ratcliffe, D., Street, H. E. (1980.): The effect of nutrient composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G. Don cells grown in batch culture. J. Exp. Bot., 31: 1315-1325.
80. Mathes, M.C., Morselli, M., Marvin, J.W. (1973.): Use of various carbon sources by isolated maple callus cultures. Plant Cell Physiol., 14: 797-801.
81. McGregor, L.J., Mchughen, A. (1990.): The influence of various cultural factors on anther culture of four cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Can. J. Plant Sci., 70: 183-192.
82. Mengel, K., Kirkby, E.,A. (1982.): *Principles of Plant Nutrition*. 3rd Edition. Internat. Potash Institute, Bern, Switzerland.
83. Miller, C. O. (1954.): The influence of cobalt and sugar upon the elongation of etiolated pea stem segments. Plant Physiol., 29: 79-82.
84. Mishra, D., Kar, M. (1975.): Nickel in plant growth and metabolism. Bot. Rev., 40: 395-452.
85. Mitchell, E.D., Johnson, B.B., Whittle, T. (1980.): β- galactosidase activity in cultured cotton cells (*Gossypium hirsutum* L.). A comparison between cells growing on sucrose and lactose. In Vitro, 16: 907-912.
86. Morel,G., Muller, J.-F. (1964.): *In vitro* culture of the apica meristem of the potato. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, 258: 5250-5252.
87. Morel, G., Wetmore, R.H. (1951.): Tissue culture of monocotyledons. Am. J. Bot., 38: 138-140.

88. Morel, G. (1946.): Action de l'acid pantothénique sur la croissance de tissus d'Aubépine cultivés *in vitro*. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, 223: 166-168.
89. Muralidhar, C. E., Mehta, A.,R. (1982.): Clonal propagation of three ornamental plants through tissue culture methods. pp. 693-694 in A. (ed.) 1982 (q.v.).
90. Murashige, T., Tucker, D.P.H. (1969.): Growth factor requirements of citrus tissue culture. pp. 1155-1161 in Chapman H. D. (ed.) Proc. 1st Int. Citrus Symp. Vol. 3, Univ. Calif., Riverside Publication.
91. Murashige, T., Skoog, F. (1962.): A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
92. Nickell, L.G., Maretzki, A. (1969.): Growth of suspension cultures of sugarcane cells in chemically defined media. Physiol. Plant., 22: 117-125.
93. Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1965.): Néoformation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts: *Plumbaga indica* L. Ann. Phys. Vég., 7: 251-256.
94. Nobécourt, P. (1937.): Culture en serie des tissus végétaux sur milieux artificial. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 205: 521-523.
95. Norstog, K., Smith, J. (1963.): Culture of small barley embryos on defined media. Science, 142: 1655-1656.
96. Orczyk, W., Malepszy, S. (1985.): *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. V. Stabilizing effect of glycine on leaf protoplasts. Plant Cell Rep., 4: 269-273.
97. Ozanne, P. G. (1958.): Chlorine deficiency in soils. Nature, 182: 1172-1173.
98. Ozanne, P. G., Woolley, J. T., Broyer, T. C. (1957.): Chlorine and bromine in the nutrition of higher plants. Austr. J. Biol. Sci., 10: 66-79.
99. Pasqualetto, P.-L., Zimmerman, R. H., Fordham, I. (1988.): The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult., 14: 31-40
100. Pierik, R.L.M., Sprenkels, P.A., Van Der Harst, B., Van Der Meys, Q.G. (1988.): Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *In vitro*. Sci. Hortic., 34: 139-153.
101. Pierik, R. L. M. (1988.): *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. Acta Hortic., 226: 25-40.
102. Polikarpochkina, R.T., Gamburg, K.Z., Khavin, E.E. (1979.): Cell-suspension culture of maize (*Zea mays* L.). Z. Pflanzenphysiol., 95: 57-67.
103. Pollard, A. S., Parr, A. J., Loughman, C. L. (1977.): Boron in relation to membrane function in higher plants. J. Exp. Bot., 28: 831-841.

104. Quoirin, M., Lepoivre, P. (1977.): Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Hortic., 78: 437-442.

105. Rains, D. W. (1976.): Mineral metabolism. pp. 561-597 in Bonner J. and Varner J.L. (eds.) 1976 *Plant Biochemistry*. Academic Press, New York.

106. Rangan, T.S. (1974.): Morphogenic investigations on tissue cultures of *Panicum miliaceum*. Z. Pflanzenphysiol., 72: 456-459.

107. Rangan, T.S. (1984.): Clonal propagation. pp. 68-73 in Vasil I.K. (ed.) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* Vol. 1. Acad. Press, New York.

108. Rangan, T.S., Murashige, T., Bitters, W.P. (1968.): *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic *Citrus*. HortScience 3, 226-227.

109. Raquin, C. (1983.): Utilization of different sugars as carbon sources for *in vitro* anther culture of petunia. Z. Pflanzenphysiol. 111, Suppl., 453-457.

110. Raven, J. A. (1986.): Biochemical disposal of excess H^+ in growing plants? New Phytol., 104: 175-206.

111. Reidiboym-Talleux, L., Diemer, F., Sourdioux, M., Chapelain, K., De-March, G.G. (1999.): Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*), effect of maltose and ABA supplements. Plant Cell Tissue Organ Cult., 55: 199-209.

112. Reuveny, Z., Dougall, D. K., Trinity, P. M. (1980.): Regula-tory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 6670-6672.

113. Robbins, W.J., Bartley, M.A. (1937.): Vitamin B, and the growth of excised tomato roots. Science, 85: 246-247.

114. Robbins, W.J., Schmidt, M.B. (1939. a): Vitamin B6, a growth substance for isolated tomato roots. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 25: 1-3.

115. Robbins, W.J., Schmidt, M.B. (1939. b): Further experiments on excised tomato roots. Am. J. Bot., 26: 149-159.

116. Rodriguez, G., Lorenzo Martin, J.R. (1987.): *In vitro* propagation of Canary Island banana (*Musa acuminata* Colla AAA var. Dwarf Cavendish). Studies of factors affecting culture obtention, preservation and conformity of the plants. Acta Hortic., 212: 577-583.

117. Roest, S., Bokelmann, G.S. (1975.): Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *in vitro*. Sci. Hortic., 3: 317-330.

118. Salisbury, F. B. (1959.): Growth regulators and flowering. II. The cobaltous ion. Plant Physiol., 34: 598-604.

119. Sarkar, D., Pandey, S. K., Sud, K. C., Chanemoug-Asoundharam, A. (2004.): *In vitro*

characterization of manga-nese toxicity in relation to phosphorus nutrition in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Sci., 167: 977-986.

120. Savage, A.D., King, J., Gamborg, O.L. (1979.): Recovery of a pantothenate auxotroph from a cell suspension culture of *Datura innoxia* Mill. Plant Sci. Lett., 16: 367-376.

121. Schwambach, J., Fadanelli, C., Fett-Neto, A. G. (2005.): Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. Tree Physiol., 25: 487-494.

122. Sharma, C. P., Singh, S. (1990.): Sodium helps overcome potass-ium deficiency effects on water relations of cauliflower. HortScience, 25: 458-459.

123. Skinner, J.C., Street, H.E. (1954.): Studies on the growth of excised roots. II. Observations on the growth of excised groundsel roots. New Phytol., 53: 44-67.

124. Skokut, T. A., Filner, P. (1980.): Slow adaptive changes in urease levels of tobacco cells cultured on urea and other nitrogen sources. Plant Physiol., 65: 995-1003.

125. Street, H. E. (1977.): Laboratory organization. pp. 11-30 in Street H.E. (ed.) *Plant Tissue and Cell Culture*. Bot. Monographs Vol.11, Blackwell Scientific Public-ations. Oxford, London.

126. Street, H. E., McGonagle, M. P., McGregor, S. M. (1952.): Observations on the 'staling' of White's medium by excised tomato roots. II. Iron availability. Physiol. Plant., 5: 248-276.

127. Street, H. E., McGregor, S. M. (1952.): The carbohydrate nutri-tion of tomato roots. III. The effects of external sucrose concen-tration on the growth and anatomy of excised roots. Ann. Bot., 16: 185-205.

128. Strickland, S.G., Nichol, J.W., McCall, C.M., Stuart, D.A. (1987.): Effect of carbohydrate source on alfalfa embryogenesis. Plant Sci., 48: 113-121.

129. Subbarao, G. V., Ito, O., Berry, W. L., Wheeler, R. M. (2003.): Sodium – a functional plant nutrient. Crit. Rev. Plant Sci. ,22: 391-416

130. Tanimoto, S., Harada, H. (1986.): Involvement of calcium in adventitious bud initiation in *Torenia* stem segments. Plant Cell Physiol., 27: 1-10.

131. Taubck, K. (1942.): Über die Lebensnotwendigkeit des Aluminiums fur Pteridophyten. Bot. Arch., 43: 291-295.

132. Taylor, R. M. (1972.): Germination of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) pollen on an artificial medium. Crop Sci., 12: 243-244.

133. Teasdale, R. D. (1987.): Micronutrients. pp. 17-49 in Bonga and Durzan (eds.) 1987 *Cell and Tissue Culture in Forestry* Vol 1. *General Principles and Biotechnology*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. ISBN 90-247-3430-4.

134. Telle, J., Gautheret, R.J. (1947.): Sur la culture indéfinie des tissus de la racine de jusquiame (*Hyascyamus niger*). Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 224: 1653-1654.

135. Thom, M., Maretzki, A., Komor, E., Sakai, W.S. (1981.): Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. Plant Cell Tissue Organ Cult., 1: 3-14.

136. Trelease, S.F., Trelease, H.M. (1933.): Physiologically balanced culture solutions with stable hydrogen-ion concentration. Science, 78: 438-439.

137. Tremblay, F.M., Lalonde, M. (1984.): Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. Plant Cell Tissue Organ Cult., 3: 189-199.

138. Tremblay, F.M., Nesme, X., Lalonde, M. (1984.): Selection and micropropagation of nodulating and non-nodulating clones of *Alnus crispa* (Ait.) Pursh. Plant Soil, 78: 171-179.

139. Trindade, H., Pais, M.S. (1997.): *In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. In Vitro Cell. Dev.-Pl., 33: 1-5.

140. Tulecke, W., Weinstein, L.H., Rutner, A., Laurencot, H.J. (1961.): The biochemical composition of coconut water as related to its use in plant tissue culture. Contrib. Boyce Thomps., 21: 115-128.

141. Van Der Krieken, W.M., Breteler, H., Visser, M.H.M., Jordi, W. (1992.): Effect of light and riboflavin on indolebutyric acid-induced root formation on apply *in vitro*. Physiol. Plant., 85: 589-594.

142. Van Overbeek J., Conklin, M.E., Blakeslee. A.F. (1941.): Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. Science, 94: 350-351.

143. Van Overbeek, J., Conklin, M.E., Blakeslee, A.F. (1942.): Cultivation *in vitro* of small *Datura* embryos. Am. J. Bot., 29: 472-477.

144. Verma, D.C., Dougall, D.K. (1977.): Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. Plant Physiol., 53: 81-85.

145. Weinstein, L. H., Robbins, W. R., Perkins, H. F. (1951.): Chelating agents and plant nutrition. Science, 120: 41-43.

146. Welander, T. (1977.): *In vitro* organogensis in explants from different cultivars of *Begonia hiemalis*. Physiol. Plant., 41: 142-145.

147. White, M.C., Decker, A.M., Chaney, R.L. (1981.): Metal complexation in xylem fluid. I. Chemical composition of tomato and soybean stem exudate. Plant Physiol., 67: 292-300.

148. White, P.R. (1934.): Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol., 9: 585-600.
149. White, P.R. (1937.): Survival of isolated tomato roots at sub-optimal and supra-optimal temperatures. Plant Physiol., 12: 771-776.
150. White, P.R. (1943. b): Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. Growth, 7: 53-65.
151. White, P. R. (1938.): Accessory salts in the nutrition of excised tomato roots. Plant Physiol., 13: 391-398.
152. White, P. R. (1939.): Glycine in the nutrition of excised tomato roots. Plant Physiol., 14: 527-538.
153. Wolter, K.E., Skoog, F. (1966.): Nutritional requirements of Fraxinus callus cultures. Am. J. Bot., 53: 263-269.
154. Wood, H.N., Braun, A.C. (1961.): Studies on the regulation of certain essential biosynthetic systems in normal and crown-gall tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47: 1907-1913.
155. Xie, J., Gao, M., Cai, Q., Cheng, X., Shen, Y., Liang, Z.. (1995.): Improved isolated microspore culture efficiency in medium with maltose and optimized growth regulator combination in japonica rice (*Oryza sativa*). Plant Cell Tissue Organ Cult., 42: 245-250.
156. Zhou, T.S. (1995.): *In vitro* culture of *Doritaenopsis*: comparison between formation of the hyperhydric protocorm-like-body (PLB) and the normal PLB. Plant Cell Rep., 15: 181-185.
157. Zimmerman, R.H. (1979.): The laboratory of micropropagation at Cesena, Italy. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc., 29: 398-400.
158. Zink, M. W., Veliky, I. A. (1979.): Acid phosphatases of Ipomoea sp. cultured *in vitro*. 1. Influence of pH and inorganic phosphate on the formation of phosphatases. Can. J. Bot., 57: 739-753.

Internet:

1. Feuer, A.E. (2012.): The Effects of Human Vitamins and Dietary Supplements on the Growth of Parsley Plants. URL: http://www.usc.edu/CSSF/History/2004/Projects/J1409.pdf Pristupljeno: 22.5.2017.

2. http://www.moje-instrukcije.com/lekcije/biologija/Biologija-Biljni%20hormoni.pdf Pristupljeno: 5.6.2017.

3. https://prezi.com/bbpoezesxt84/studying-the-effect-of-vitamin-e-on-spider-plants/ Pristupljeno: 22.5.2017.

4. https://www.zdravobudi.hr/clanak/206/zamjene-za-secer Pristupljeno: 24.5.2017.

5. Očić, G., Majsec, L. (2014.): Utjecaj vitamina D na rast biljaka. URL: http://www.hbd-sbc.hr/wordpress/wp-content/uploads/2014/09/Utjecaj-vitamina-D-na-rast-biljaka.pdf Pristupljeno: 22.5.2017.

6. Schmid, A., Buchala A.J. (1987.): An examination of the growth substance activity of vitamin D_3 URL: https://link.springer.com/article/10.1007/BF02087186 Pristupljeno: 22.5.2017.

7. Ševo, A. (2011.): Biljke iz staklenke – kultura biljnih tkiva i stanica „in vitro“. URL: http://www.horti-kultura.hr/biljke-iz-staklenke-kultura-tkiva-i-stanica-in-vitro Pristupljeno: 28.5.2017.

8. www.ss-medicinska-ri.skole.hr/dokumenti?dm_document_id=6242&dm_dnl=1 Pristupljeno: 27.5.2017.

11. Sažetak

In vitro uzgoj biljnih tkiva i organa odvija se na hranjivoj podlozi koja sadrži neophodne elemente za rast i razvoj same biljke. Hranjive podloge u kulturi tkiva ne osiguravaju samo anorganske hranjive tvari, nego obično i ugljikohidrate kako bi zamijenila ugljik koji biljke obično fiksiraju iz atmosfere fotosintezom. Kako bi se poboljšao rast, mnoge hranjive podloge sadrže u tragovima određene organske spojeve, značajne vitamine te biljne regulatore rasta. Svaka hranjiva podloga mora biti vrlo sterilna. Sterilizacija hranjive podloge se može vršiti na više načina: fizičkim uništavanjem mikroorganizama suhim vrućim zrakom, vrelom parom (autoklav) ili zračenjem (UV svjetlom ili g - zračenjem), kemijskim uništavanjem mikroorganizama pomoću različitih preparata. U Hrvatskoj, ali i svijetu raste velik broj endemičnih, ugroženih i rijetkih biljnih vrsta koje svakako vrijedi sačuvati. U tome bi mogli pomoći ovakvi načini zaštite.

Ključne riječi: biljna tkiva, hranjiva podloga, hranjive tvari

12. Summary

In vitro cultivation of plant tissues and organs takes place on a nutrient medium containing the necessary elements for the growth and development of plants. Nutrient substrates in tissue culture do not only provide inorganic nutrients, but are usually carbohydrates to replace carbon which plants usually take place in a photosynthesis atmosphere. To enhance growth, many nutrients contain traces of certain organic compounds, important vitamins and plant growth regulators. Each nutrient must be very sterile. Sterilization of nutrient media can be done in several ways: physical destruction of microorganisms by dry hot air, autoclaves or radiation (by UV light or g - radiation), chemical destruction of microorganisms by various preparations. In Croatia, but also around the world, a large number of endemic, endangered and rare plant species are growing which is worth preserving. It could help this kind of protection.

Key words: plant tissues, nutrient substrates, nutrients

13. Popis slika

Broj slike	Naziv slike	Stranica
Slika 1	Prikaz hranjive podloge u kulturi tkiva	2
Slika 2	Dušik	3
Slika 3	Madagaskarski zimzelen; Vinka (*Catharanthus roseus* L.)	6
Slika 4	Biljka *Bryophyllum tubiflorum* L.	8
Slika 5	Lucerna (*Medicago sativa* L.)	9
Slika 6	Torenija (*Torenia fournieri* L.)	10
Slika 7	Mikroelementi	11
Slika 8	Kokosova palma	15
Slika 9	Simbol elementa željeza načinjen od sjemenki suncokreta	17
Slika 10	Niacin u biljkama	18
Slika 11	Vitamin C	21
Slika 12	Kokos i kokosovo mlijeko	24
Slika 13	Limunska kiselina	25
Slika 14	L – jabučna kiselina u pakiranju	26
Slika 15	Kukuruzni sirup	28

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

Komponente hranjive podloge u kulturi tkiva

Stojan Lovrić

Sažetak:

In vitro uzgoj biljnih tkiva i organa odvija se na hranjivoj podlozi koja sadrži neophodne elemente za rast i razvoj same biljke. Hranjive podloge u kulturi tkiva ne osiguravaju samo anorganske hranjive tvari, nego obično i ugljikohidrate kako bi zamijenila ugljik koji biljke obično fiksiraju iz atmosfere fotosintezom. Kako bi se poboljšao rast, mnoge hranjive podloge sadrže u tragovima određene organske spojeve, značajne vitamine te biljne regulatore rasta. Svaka hranjiva podloga mora biti vrlo sterilna. Sterilizacija hranjive podloge se može vršiti na više načina: fizičkim uništavanjem mikroorganizama suhim vrućim zrakom, vrelom parom (autoklav) ili zračenjem (UV svjetlom ili g - zračenjem), kemijskim uništavanjem mikroorganizama pomoću različitih preparata. U Hrvatskoj, ali i svijetu raste velik broj endemičnih, ugroženih i rijetkih biljnih vrsta koje svakako vrijedi sačuvati. U tome bi mogli pomoći ovakvi načini zaštite.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: dr.sc. Monika Tkalec

Broj stranica: 50
Broj grafikona i slika: 15
Broj tablica: -
Broj literaturnih navoda: 166
Broj priloga: -
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biljna tkiva, hranjiva podloga, hranjive tvari

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Nada Parađiković, predsjednik
2. dr. sc. Monika Tkalec, mentor
3. doc. dr. sc. Tomislav Vinković, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of Agriculture
University Graduate Studies, Vegetables and Floriculture

Components od Plant Tissue Culture Media

Stojan Lovrić

Abstract:

In vitro cultivation of plant tissues and organs takes place on a nutrient medium containing the necessary elements for the growth and development of plants. Nutrient substrates in tissue culture do not only provide inorganic nutrients, but are usually carbohydrates to replace carbon which plants usually take place in a photosynthesis atmosphere. To enhance growth, many nutrients contain traces of certain organic compounds, important vitamins and plant growth regulators. Each nutrient must be very sterile. Sterilization of nutrient media can be done in several ways: physical destruction of microorganisms by dry hot air, autoclaves or radiation (by UV light or g - radiation), chemical destruction of microorganisms by various preparations. In Croatia, but also around the world, a large number of endemic, endangered and rare plant species are growing which is worth preserving. It could help this kind of protection.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek
Mentor: DSc. Monika Tkalec

Number of pages: 50
Number of figures: 15
Number of tables: -
Number of references: 166
Number of appendices: -
Original in: Croatian

Key words: plant tissues, nutrient substrates, nutrients

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. DSc. Nada Parađiković, Full Professor, chair
2. DSc. Monika Tkalec, mentor
3. DSc. Tomislav Vinković, Full Professor, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.