Utjecaj svjetla te koncentracije hormona na rast ljutike (Allium ascalonicum L.) in vitro

Kujundžić, Toni

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:151:113319

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Toni Kujundžić, apsolvent
Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

Utjecaj svjetla te koncentracije hormona na rast ljutike (*Allium ascalonicum* L.) *in vitro*

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Toni Kujundžić, apsolvent
Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

Utjecaj svjetla te koncentracije hormona na rast ljutike (*Allium ascalonicum* L.) *in vitro*

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Toni Kujundžić, apsolvent
Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

Utjecaj svjetla te koncentracije hormona na rast ljutike (*Allium ascalonicum* L.) *in vitro*

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

Osijek, 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. PREGLED LITERATURE 5

3. MATERIJAL I METODE 12

4. REZULTATI 18

5. RASPRAVA 22

6. ZAKLJUČAK 24

7. POPIS LITERATURE 25

8. SAŽETAK 29

9. SUMMARY 30

10. POPIS TABLICA 31

11. POPIS SLIKA 32

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Ljutika ili luk kozjak, (*Allium ascalonicum*) potječe s područja današnje Palestine i raširena je gotovo po cijelom Orijentu i srednjoj Aziji. Od davnina se koristi u ishrani i u narodnoj medicini. Kao i ostale vrste roda *Allium* ekstrakt ove vrste ima jaku antioksidativnu aktivnost (Leelarungrayub i sur., 2006.) i antimikrobno djelovanje (Adeniyi i Anyiam, 2004; Mahmoudabadi i Nasery, 2009.). To je dvogodišnja biljaka, koja se samorazmnožavanjem može održati više godina na istom mjestu.

Kod nas se najčešće uzgaja za vlastite potrebe, te nema velikog tržišnog značaja. Prema podatcima iz 2002. u svijetu se uzgaja na 100 000ha, najviše u Meksiku, Japanu te Aziji. Kod nas je raširena u priobalnom području. Glavna razlika između luka i ljutike je ta što ljutika ima manje lukovice koje rastu na istoj stabljici te ih može biti od 3 do 20. Sadi se obično na gredice po 4 do 5 redova, s razmakom redova od 30 cm i unutar rednim razmakom 15 do 20 cm budući da je tolerantan na niske temperature, može se saditi u jesen ili u proljeće. Dozrijeva sredinom ljeta. Prinosi mogu biti 20 do 30t/ha (Lešić i sur., 2002.).

Prema podatcima Savjetodavne službe, ljutika dobro podnosi nešto hladniju klimu, a na prostorima naših otoka i priobalja nekada je bila u daleko većoj uporabi nego danas. Nije izbirljiva te podnosi slabije plodna tla, za optimalan, kvalitetan i profitabilan uzgoj traži dobro pripremljeno tlo, koje se obradi na dubinu do 25 cm. Pretežno joj odgovaraju neutralna do blago alkalna tla. Ne podnosi kisela zbijena i vlažna tla. Ljutiku se u osnovi gnoji NPK gnojivom i to prvi put formulacijom 10:20:30 neposredno pred pripremu tla ili oranje. Drugi put se unosi u tlo na dubinu do 12 cm. Za prihranu se koristi mineralno gnojivo N:P:K formulacije 15:15:15, ako je tlo siromašnije i to ne s više od 50 gr/m^2 .

http://www.savjetodavna.hr/savjeti/17/551/ljutika/

Rod *Allium* L. obuhvaća oko 750 vrsta (Friesen i sur., 2006.) te spada u jedan od najvećih rodova među jednosupnicama. Klasifikacija je rod *Allium* u početku svrstavala u porodicu *Liliaceae*, a nakon toga u rod *Amarylidaceae.* Prema (Fritsch i Friesen, 2002.) rod *Allium* i njegovi bliski srodnici su uvršteni u poradicu *Alliaceae. Rod Allium* je široko rasprostranjen. Biljke su prilagođene umjerenim klimatskim uvjetima sa malom do promjenjivom količinom

pristupačne vode (Song i sur. 2007.). Vrste unutar roda *Allium* su dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke sa podzemnim organima lukovicama ili rizomima (Kamenetsky i Rabinowitch, 2006.). Tijekom prve godine većina lukova formira lukovicu, a iduće godine cvijeta. Unutar roda postoje samonikle te ekononomski značajne sorte. Jestive biljke roda *Allium* se koriste kao svježe povrće, osušeno ili kao začinske biljke (Song i sur. 2007.). Prema (Kamenetsky i Rabinowitch, 2006.), ekonomski značajne vrste unutar roda *Allium su:*

- *A. cepa*
- *A. sativum*
- *A. fistulosum*
- *A. ameloprasum*
- *A. schoenoprasum*
- *A. tuberosum*

Tablica 1. Taksonomska klasifikacija prema (ITIS bazi)

Carstvo:	*Plantae*
Divizija:	*Liliopsida*
Razred:	*Liliopsida*
Red:	*Asparagales*
Porodica:	*Alliaceae*
Rod:	*Allium*
Vrsta:	***A.ascalonicum L.***

Unutar roda Allium nalazi se vrsta *Allium cepa var. ascalonicum* L. poznata kao i ljutika (shallot). Za navedenu vrstu koriste se sinonimi:

› *Allium cepa var. aggregatum* G.Don

› *Allium cepa var. Ascalonicum* L.

Prema taksonomiji Universal Protein Resource (UniProt) koja je sveobuhvatna baza podataka za sekvencu proteina i bilješki koji su preduvjet za klasifikaciju. Oni svoju povezanost *var. ascalonicum* i *var. aggregatum* temelje na dva zajednička proteina:

- Alliin lyase

- Ascalin

Iako nije prihvaćen od strane ITIS baze (Integrated Taxonomic Information System) *Allium cepa var. aggregatum G.Don* je i dalje u uporabi.

Tablica 2. Prema „U.S national plant germplasm system“, imena ljutike u svijetu https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?101652

Naziv	Izvor	Govorno područje
ever-ready onion	Zander ed17	Engleska
multiplier onion	Mansf Ency	Engleska
potato onion	Mansf Ency	Engleska
shallot	World Econ Pl	Engleska
échalote	Dict Rehm	Francuska
oignon patate	UPOV	Francuska
schalotte	Dict Rehm	Njemačka
chalota	Dict Rehm	Portugal
chalote	Dict Rehm	Španjolska
escaluña	Dict Rehm	Španjolska
huo cong	F ChinaEng Transcribed Chinese	Kina



Slika 1 a), b), c). Sjeme, stabljika, lukovica *A. ascalonicum (*Izvor*:*

a) https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ALAS2

b) http://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Allium+cepa+ascalonicum

c) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/22/Shallots_-_sliced_and_whole.jpg)

Tablica 3. Nutritivna vrijednost ljutike prema Saraswathi i sur. (2017.)

Energija	301 KJ (72kcal)
Ugljikohidrati	16,8g
Šećeri	7,87 g
Dijetalna vlakna	3,2 g
Mast	0,1 g
Protein	2,5 g
Vitamin B_1 (tiamin)	0,06 mg (5%)
Vitamin B_2 (riboflavin)	0,02 mg (2%)
Vitamin B_3 (niacin)	0,2 mg (1%)
Vitamin B_5 (Pantotenska kiselina)	0,29 mg (6%)
Vitamin B_6	0,345 mg (27%)
Vitamin B_9 (Folna kiselina)	34 µg (9%)
Vitamin C	8 mg (10%)
Kalcij	37 mg (4%)
Željezo	1,2 mg (9%)
Magnezij	21 mg (6%)
Mangan	0,292 mg (14%)
Fosfor	60 mg (9%)
Kalij	334 mg (7%)
Cink	0,4 mg (4%)

Cilj istraživanja je bio utvrditi utjecaj osvjetljenja i različite koncentracije hormona na početni porast eksplantata ljutike *in vitro.*

2. PREGLED LITERATURE

Unutar roda *Allium* postoji puno vrsta, koje su pronađene od Sjeverne Amerike, Europe, Sjeverne Afrike i Azije. Približno 30 vrsta se redovito koristi u ishrani ljudi, među kojima je najznačajniji crveni luk, bijeli luk, vlasac i ljutika. Grčki povjesničar Herodot zapisao je kako su luk, rotkvica i češnjak bili glavna hrana radnika koji su izgradili Velike Piramide u Gizi. Ljutika ima isti aromatski sastav kao i crveni luk ali, u pravilu sadrži više metil, propil i 1-propenil di- i trisulfida (Peterson, 2000.).

Mikrorazmnožavanje u odnosu na klasično vegetativno razmnožavanje ima sljedeće posebitosti: *in vitro* razmnožavanje mnogo je brže u odnosu na *in vivo* razmnožavanje, moguće je razmnožavati i biljke koje u uvjetima *in vivo* nije moguće, javlja se povećani vigor i produktivnost *in vitro* biljaka, potrebno je malo početnog materijala te znatno manji prostor, moguća je proizvodnja kroz čitavu godinu bez sezonskog utjecaja te se razmnožavaju samo zdrave biljke. Mikrorazmnožavanje može imati i određene nedostatke koji su vidljivi kroz: nisku genetičku stabilnost pojedinih *in vitro* sustava, ispoljavanje loših značajki nakon prijenosa biljaka iz kulture u uvjete *in vivo*, otežano ukorjenjivanje *in vitro* reznica, otežan prijenos pojedinih vrsta iz *in vitro* u *in vivo* uvjete, osjetljivost *in vitro* biljaka na patogene, gubitak regenerativne sposobnosti nakon određenog broja supkultura, otežana sterilizacija eksplantata te visoka cijena koštanja *in vitro* biljaka (Jelaska, 1994.).

Klasično oplemenjivanje vrsta roda *Allium* je otežano zbog toga što su to dvogodišnje biljke pa je za dobivanje čistih linija najčešće potrebno 8 - 10 godina. Neki od lukova kao što je bijeli luk su sterilni pa se mogu razmnožavati isključivo vegetativno. Taj problem dodatno otežava i činjenica da nakon nekoliko ciklusa samooprašivanja kod lukova najčešće dolazi do genetičke depresije uslijed nagomilavanja letalnih gena (Bohanec, 2002; Murovec i Bohanec, 2012.). Većina tih problema se mogu riješiti ili umanjiti modernim metodama kulture tkiva, molekularne biologije i genetičkog inženjeringa koje omogućavaju uvođenje poželjnih svojstava u već izabrane elitne genotipove. Budući da vrste roda *Allium* imaju veliki ekonomski i farmaceutski također su bile predmet ovih istraživanja tijekom niza godina. Do sada nije pronađen efikasan protokol za genetičku transformaciju (Song i sur., 2007; Eady i sur., 2008; Kenel i sur., 2010.). Da bi se kompenzirala niska efikasnost procesa genetičke transformacije, protokol za regeneraciju mora biti što efikasniji. Efikasnost genetičke transformacije se najčešće kreće u opsegu 0,05-4% (Zheng i sur. 2001; Park i sur. 2002; Eady i sur. 2008; Kenel i sur. 2010.).

70-ih godina prošloga stoljeća razrađen je postupak mikropropagacije na voćnim vrstama, posebno na jagodama i podlogama za razne vrste roda *Prunus*. Pojava mikropropagacije bila je trijumf primjene metoda kulture *in vitro* u klonskom razmnožavanju biljaka. Mikropropagacija je omogućila veliku brzinu razmnožavanja tijekom cijele godine u laboratorijskim uvjetima, gdje je moguće osigurati apsolutnu kontrolu uvjeta rasta i zdravstvenog stanja kulture (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996.).

Skoog i Miller (1957.) su napravili prekretnicu u radu s biljnim *in vitro* kulturama kada su utvrdili da se odnosom citokinina i auksina može regulirati organogeneza (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996.).

Mikrorazmnožavanje je moguće podijeliti u sljedeće faze:

Postupci prije kulture – Obuhvaća pravilno postupanje s početnim materijalom i njegovo čuvanje u zdravom stanju. Izvorno biljno tkivo od kojeg će biti uzeti eksplantati i postupak koji će se primijeniti imaju ključnu ulogu u uspješnom mikrorazmnožavanju.

Uvođenje u kulturu – Primarni cilj ove faze je postići sterilan rast eksplantata. Ova faza uključuje površinsku sterilizaciju i izolaciju eksplantata.

Multiplikacija – Njen zadatak je postići razmnožavanje bez gubitka genetičke stabilnosti. Prilagodba faktora hranjive podloge (prvenstveno hormona) najbolji je način za regulaciju multiplikacije i regeneracije *in vitro*.

Priprema kultura za prijenos biljčica u zemlju – Obuhvaća zaustavljanje stvaranja aksilarnih izdanaka ili/i početak izduživanja izdanaka te poticanje stvaranja korijena. Izdanci se obično pojedinačno prenose na podlogu za zakorjenjivanje, dok se kod vrsta koje se lako zakorjenjuju izdanci mogu izravno prenijeti u supstrat/tlo.

Prijenos biljčica u tlo – Prilagodba biljaka na rast u vanjskim uvjetima. (Jelaska,1994.).

Primjenom biotehnoloških postupaka omogućava potpuno eliminiranje virusa koji su često prisutni u uzgajanim vrstama biljaka. To je posebno važno za sterilne biljke koje se

razmnožavaju vegetativno poput *A. sativum* sa niskim koeficijentom multiplikacije i sa velikom vjerojatnošću prijenosa virusa (Novak, 1990.).

Postoji više faktora koji utječu na regeneraciju biljka. Neki od najvažnijih su: tip eksplantata, fiziološko stanje eksplantata, genotip i primijenjena kombinacija regulatora rasta (Scotton i sur., 2013.).

Hidayat (2005.) navodi da samo vrhovi izdanka eksplantata reagiraju kroz izravnu promjenu adventivne šupljine ili stvaranja kalusa, vrhovi izdanaka ekplantata izvađeni iz esplantata čuvanih na 4°C kroz četiri tjedna prije izrezivanja, dali su snažniji porast i proizveli više izbojaka po kulturi. Ti proliferirani izdanci i kalus su dali mnogo bolju proliferaciju i porast. Vrhovi izdanaka eksplantata (4 °C) na BDS mediju s 0,1 mg/l piklorama i 1,0 mg/l tidiazurona daju najveći broj izbojaka (25 izbojaka po kulturi).

Cho i sur. (2007.) su istraživali ljutiku donesenu iz Francuske koja je trebala poslužiti kao novi zimski usjev s ciljem da se s godinama razvije u izvoznu kulturu. Tijekom uvodnih uzgojnih pokusa pojavili su se neki problemi kao što su prerana depresija rasta u rano ljeto, osjetljivost na ljetnu vlažnost i slabljenje snage lukovica nakon uzastopnog razmnožavanja. Ističu kako je kultura tkiva bila dobra za dobivanje lukovica bez virusa, ali je bila ograničena dugim razdobljem uvođenja u kulturu i niskom brzinom propagacije.

Autori Mohamed-Yasseen, i sur. (1994.) u svom radu opisuju postupak za regeneraciju izbojaka i lukovica češnjaka i ljutike *in vitro* s visokom frekvencijom od izbijanja vrhova pomoću benziladenina ili tidiazurona. Regenerirani izbojci su inducirani da oblikuju lukovice u Murashige i Skoog mediju koji sadrži 5 g L^{-1} aktivnog ugljena i 120 g L^{-1} saharoze u uvjetima dugog dana. Lukovice stvorene *in vitro* prenesene su na tlo bez aklimatizacije i proizvedene su samoodržive biljke. Ističu da bi ova metoda mogla bi biti korisna za proizvodnju s niskim troškovima.

Walkey i sur. (1987.) ističu kako gotovo svi kultivari češnjaka i ljutike koji se koriste za uzgoj u Velikoj Britaniji su zaraženi s dva ili više virusa. Postotak regeneracije biljaka češnjaka i ljutike (*A. ascalonicum L.)* bez virusa povećan je s 25-50% na 85%, kada su zaražene roditeljske biljke podvrgnute termoterapiji na 38 °C prije uvođenja u kulturu tkiva.

Hailekidan i sur. (2013.) su proveli istraživanje kako bi se razvio učinkovit protokol za *in vitro* regeneraciju luka (*Allium cepa*). Kao pokusni materijal upotrijebljene su dvije lokalne

sorte (Huruta i Minjar) od kojih su korišteni bazalni diskovi kao eksplantati. Murashige i Skoog medij je bio dopunjen različitim koncentracijama i kombinacijama 2,4-diklorofenoksioctene kiseline, 6-benzilaminopurina, kinetina i α-naftalen octene kiseline za indukciju i regeneraciju biljaka. Maksimalna indukcija kalusa zabilježena je u genotipu Huruta (81,11%) u mediju dopunjenim s 1 mg/L 2, 4-diklorofenoksioctene kiseline. U kombiniranom učinku, i Huruta i Minjar su pokazali najveću indukciju kalusa (74,44%) bazalnih diskova smještenih u mediju dopunjenom s 1 mg/L 2,4-diklorofenoksioctene kiseline. Među različitim tipovima i kombinacijama regulatora rasta, maksimalna težina kalusa od 1,26 i 1,20 g postignuta je s 1 mg/L 2, 4-diklorofenoksioctene kiseline i α-naftalenacetatnom kiselinom kombiniranom sa 1 mg/L 6-benzilaminopurina. Murashige i Skoog medij nadopunjen s 5.0 mg/L 6-benzilaminopurin + 0.1 mg/L α-naftalen octene kiseline pokazali su veći postotak regeneracije (91.11%). Dodatak 1,5 mg/L indol-3-maslačna kiselina + 2 mg/L 6-benzilaminopurin se pokazalo kao optimalna koncentracija kojom se dobiva 86,66% ukorijenjenih biljaka.

Bolesti uzrokovane virusima glavni su čimbenik koji ograničava učinkovitost vegetativno razmnoženih biljaka. Tehnika meristemske kulture i mikropropagacije *in vitro* jedni su od najboljih metoda za dobivanje biljaka bez virusa. Rezultati su pokazali da je najbolja metoda uvođenja biljaka u kulturu *in vitro* prethodna sterilizacija svih lukovica i izrezivanje po dvije vanjske ljuske, a najbolji medij za uzgoj mikropropagiranih biljke bio je MS medij dopunjen s 0,5 mg / L^{-1} 2iP i 0,1 mg / L^{-1} NAA (Kapusta i Gorecka, 2010.).

Istraživanja Fletcher i sur. (1998.) s ciljem izrade prototipa za *in vitro* eliminaciju virusa na dva kultivara ljutike (*Allium cepa* var. *Ascalonicum* L.), „Mikor“ i „Jermor. Eksplantati su pripremljeni, površinski sterilizirani i stavljeni na medij koji sadrži soli i vitamine Murashige i Skoog podloge (M & S) s dodatkom 3% saharoze, 1,0 mg/l benziladenina, 50 mg/L ribavirina i 0,8% agara. Eksplantati su prošli 5-6 dana kontinuirane toplinske terapije: 4 h izloženi svjetlu na 35 ° C; 4 h izloženi tami na 31 ° C. Kada su izdanci dugi 2-3 cm bili su izuzeti i prebačeni u medij za indukciju vrhova izdanka bez ribavirina (antivirusni pripravak) i uzgajani pod normalnim uvjetima kulture tkiva od 24 ° C pod fluorescentnim svjetlima s fotoperiodom od 16 h. Testovi na prisutnost virusa su potvrdili da 60% sorte 'Jermora' i 62,0% 'Mikor' uzgajanih *in vitro* biljaka su bili bez SLV i OYDV virusa.

Berljak i Benedicic (1996.) istraživali su učinke različitih tipova regulatora rasta za poboljšanje i povećanje proizvodnje slovenskog luka (*Allium ascalonicum* L. cv. Pohorka), uz korištenje *in vitro* umnažanja biljaka. Inicijalna kultura uzeta je iz bazalnih dijelova eksplantata te stavljena na BDS medij dopunjen s 4,5 μM BA. Za indukciju sljedeće generacije lukovica korišteni su izbojci *in vitro* proizvedeni dijelovi ljutike. Dodavanjem 0,6 μM IAA povećan je prosječan broj izbojaka po eksplantatu. Izolirani izbojci su formirali lukovice na BDS mediju bez hormona, dopunjenog aktivnim ugljenom i visokom koncentracijom saharoze.

Vega i sur. (2015.) su procjenjivali učinkovitost različitih oblika regeneracije i medija za stvaranje lukovica. Najbolji rezultati za regeneraciju biljaka (68% učinkovitosti) zabilježeni su sa medijom MS uz dodatak 30g L^{-1} saharoze, 1,5g L^{-1} –benomila, 1,1 µM NAA i 8,9 µM BAP-a te za regeneraciju (77% učinkovitosti) s MS medijem uz dodatak 10µM anciminidom i 50g L^{-1} saharoze. 50% svih regeneriranih biljaka iz apikalnih meristema učinkovito je aklimatizirana. Autori ističu da se razvijeni i standardizirani protokol u ovom istraživanju može koristiti za povećanje učinkovitosti proizvodnje lukovica za komercijalnu primjenu.

Le Guen-Le Saos i sur. (2002.) su proučavali formiranje lukovica kod ljutike uzgajane *in vitro*. Formiranje lukovica se odvijalo u uvjetima od 16h s fluorescentnim + svjetlom sa žarnom niti i 30-50 g L^{-1} saharoze u mediju. Egzogeni giberelin (10 µM GA3) inhibirao je rast lišća i korijena i formiranja lukovica. Kada su u medij pri koncentraciji od 10 µM GA3, dodana tri inhibitora biosinteze giberelina (ancinidol, flurprimidol i paclobutrazol) oni su potaknuli stvaranje lukovica i postotak formiranja lukovica. Kada se anciminid upotrebljavao u kombinaciji s GA3, nije otklonio učinak GA3 koji je primijenjen sam. Pod tretmanima sa 30-70 g L^{-1}saharoze, omjeri formiranja lukovica su veći od onih tretmana biljaka postignutih dodavanjem ancimidola, a svježa težina lukovica povećana je na isti način. Ancinidol je uzrokovao smanjenje sadržaja saharoze u listovima u iznosu od 66%, ali je uvelike povećao sadržaj glukoze, fruktoze i fruktana.

Afshari i sur. (2011.) su opisivali učinke zimskih i proljetnih genotipova repice (*Brassica napus* L.) ("PF7045 / 91, Okapi i Opera"), eksplantata (kotiledona i hipokotila), svjetlosti, različitih vrsta i koncentracija auksina (NAA i 2,4-diklorofenoksioctena kiselina 2,4-D), prisustvo citokinina (BA) i različite koncentracije mikro i makro elemenata (MS i ½ MS). Eklplantati su uzgajani u različitim kombinacijama medija i regulatora rasta biljaka, te su

bili podvrgnuti različitim kombinacijama svjetlosti (u mraku ili svjetlu po 10 dana). Nakon 10 dana mjerana je težina ekplantata i formiranje korijena. Rezultati pokazuju da su 2,4-D u kombinaciji s citokinomima (BA), uzrokovali brže i bolje stvaranje kalusa i samu podjela stanica, dok je NAA (s BA ili bez njega) utjecala na težinu kalusa, ne samo u individualnim tretmanima, nego i u različitim kombinacijama, stimuliranjem stvaranja korijena i rizoma. Svjetlo je imalo statistički značajnog utjecaja na svježu masu kod kotiledona i hipokotila.

Važni faktori koji utječu na *in vitro* rast su svjetlost, temperatura, vlažnost i kisik. Razina svjetlosti izražava se kao fotosintetski aktivna radijacija, a označava broj fotona po kvadratnom metru po sekundi za spektar svjetlosti valne duljine 400 – 700 nm. Količina svjetlosti koja je potrebna biljkama u kulturi tkiva znatno je niža od one koju trebaju biljke uzgajane u poljskim uvjetima. Fotosintetska aktivnost biljaka u kulturi ograničena je smanjenim intenzitetom svjetlosti i brzim trošenjem CO_2. Obično se u kulturi tkiva koristi razina svjetlosti od 60-70 μmol $m^{-2}s^{-1}$. Glavne karakteristike svjetlosti koje imaju značajan utjecaj na *in vitro* rast biljaka su kvaliteta svjetlosti, intenzitet svjetlosti i fotoperiod (Reuveni i Evanor, 2007.)

Biljke apsorbiraju plavu i crvenu svjetlost koje imaju najveći utjecaj na njihov rast i razvoj. Crvena svjetlost utječe na fotosintezu, klijanje zrna, rast presadnica i cvjetanje i razvoj plodova, dok plava svjetlost utječe na fotosintezu i vegetativni rast listova. Intenzitet plave svjetlosti utječe na stimulaciju i inhibranje rasta kalusa. Crvena svjetlost u pravilu potiče formiranje adventivnih izdanaka kod većine biljaka, ona je važna za razvoj fotosintetskog aparata, dok plava svjetlost ima ulogu u formiranju klorofila, razvoju kloroplasta, otvaranju puči, sintezu enzima i fotomorfogenezu (Goh, 2009., Kang i sur., 2008.).

Crvena svjetlost daje bolji učinak na različite biljne vrste nego plava svjetlost, iako postoje i one biljke koje reagiraju slično na obje svjetlosti, što ovisi o samom istraživanju (Jain i Ishii, 2003.).

Sama kvaliteta svjetlosti podrazumijeva određenu valnu duljinu ili boju, koja dopire do površine biljke. Fotosintetska reakcija biljaka pod utjecajem je valnih duljina ultraljubičaste (300-380 nm), plave (430-490 nm), crvene (640-700) i daleko-crvene (700-760 nm) svjetlosti (Kozai i sur., 1992.).

Čimbenici kao što su biljna vrsta, tip i stupanj razvijenosti eksplantata utječu na samu reakcija biljke na svjetlost.

Različitom kontrolom kvalitete svjetlosti (spektra svjetlosti) može se regulirati rast i razvoj u kulturi tkivate se može poboljšati kvaliteta i povećanje prinosa biljke (Economou i Read, 1987.)

Prema istraživanju Jain i Ishii, (2003.) kvaliteta svjetlosti može utjecati na biološku efikasnost regulatora rasta prisutnih u mediju kao i na endogenu hormonalnu ravnotežu nekoga tkiva.

Mnogi autori ističu svjetlost kao ključan okolišni čimbenik u životu biljke, ona ima presudnu ulogu, direktnu ili indirektnu, u regulaciji biljnog rasta i razvoja. Ubog toga su biljke razvile niz fotoreceptora koji reguliraju njihov rast i razvoj s obzirom na prisutnost, količinu, smjer, trajanje i kvalitetu svjetlosnog zračenja. Različite grupe fotoreceptora osjetljive su na različite dijelove spektra svjetlosti: fitokromi (crvena/daleko crvena svjetlost), kriptokromi (plava/UV-A svjetlost), fototropini i UV-B fotoreceptori (Briggs i Olney, 2001., Jain i Ishii, 2003.). Rajapakse i Shakah (2007.) navode da su kriptokromi i fototropini osjetljivi na plavu svjetlost, dok su fitokromi osjetljiviji na plavu nego na crvenu svjetlost.

3. MATERIJAL I METODE

Luk je dvogodišnji kultura, koja čuvajući hranu u lukovicama tijekom prve sezone, cvate u drugoj sezoni, kada dani postanu dugi i dovoljno topli.

Korijen je plitak i žiličast, slabo je razgranat ima vrlo malo korijenovih dlačica te mu je moć usvajanja slaba. Sve navedeno upućuje na to da biljka zahtijeva češće intervale zalijevanja ali s manjim količinama vode. Kod zrelijih biljaka korijen se sastoji od adventivnog korijenja koje se razvija iz stabljike.

Stabljika je skraćena, zadebljana i na njoj se razvija sočni list i centralni pup.

Svaki list se sastoji od dva glavna dijela: asimilacijskog zelenog dijela i neasimilacijskog dijela lisnog rukavca. Listovi imaju valjkast oblik koji je prema vrhu šiljastog oblika i šupalj. Boja lista ovisi o kultivaru i kreće se od sivo zelene do tamno zelene boje. Listovi su glatke površine i presvučeni su voštanom prevlakom. Kada dođe u generativnu fazu iz pupa se razvija do 1 m visoka stabljika na čijem vrhu se nalazi okrugli cvat. Listovi rastu do 40 cm u visinu i do 1 cm u promjeru.

Lukovica se sastoji od pravog stabla poput stabljike kruženog s brojnim koncentričnim slojevima od mesnih listova. Vanjske suhe ovojne ljusice imaju zaštitnu ulogu. Unutarnji listovi su mesni i sočni te su bogato oprskrbljeni rezervnim tvarima. Također se sastoji od jednog ili više pupoljaka . Pri ulasku u fazu mirovanja 3-4 vanjska lista postaju ljuskasti te imaju funkciju zaštitne lukovice od pretjeranog gubitka vode i mehaničkog oštećenja. U generativnoj fazi iz vršnog meristema se razvija cvjetna stabljika. U potpunom razvoju je šuplja, a pri dnu proširena. Na vrhu nosi cvat štitac koji je prije otvaranja obavijen jednim pricvijetnim listom. U cvatu može biti i do 100 cvjetova.

Cvjetno stablo se razvija u drugoj godini vegetacije, a može biti visoko do 120 cm. Ovisno o sorti u jednoj lukovici se može stvoriti od 1 do 20 cvijetnih stabljika. Cvat je okruglog oblika i sadrži do 700 cvjetova. Cvijet je bijele boje sa zelenom nijansom, a sastoji se od 6 listića raspoređenih u dva kruga, 6 prašnika i tučka. Stranooplodna je kultura.

Plod je tobolac sa dva do šest sjemenki. Sjeme luka je smežurano i crne boje. Klijavost može zadržati dvije do tri godine i otporno je na niske temperature prilikom nicanja. Apsolutna težina sjemena je 2,5-4,5 g (Parađiković, 2009.).

Priprema hranjive podloge

Hranjiva podloga pripremljena je prema recepturi LS (Linsmaier i Skoog., 1965.). Za istraživanje su korištene dvije različite varijante hranjive podloge koje su se razlikovale u koncentraciji hormona BAP (6-benzil aminopurina) iz grupe citokinina. Jedna varijanta hranjive podloge sadržavala je 2,0 mg/L BAP, a druga 5 mg/L BAP.

Priprema hranjive podloga odvijala se na sljedeći način:
Stavimo zagrijavati lonac u koji smo ulili vodu. Nakon zagrijavanja u vodu se dodaje agar te se miješa sve dok voda ne prokuha. Nakon toga u smjesu se dodaje šećer – saharoza. Korištenjem menzure smjesi se dodaje odgovarajuća količina makroelemenata, a pipetom odgovarajuća količina mikroelemenata, vitamina i željeza. Smjesa se zatim prelije u menzuru i nadopuni do određenog volumena. Nakon toga smjesa se ponovno vraća u lonac i podešava joj se pH na 5,8 korištenjem HCl ili NaOH. Konačni pH odredi se pomoću lakmus papira. U smjesu se dodaju hormoni indol-3-maslačna kiselina (IBA) iz grupe auksina i 6-benzil aminopurin (BAP) iz grupe citokinina. Citokinini se pripravljaju otapanjem u HCl, a auksini u NaOH (Slika 1.). Točne količine sastojaka korištenih za pripremu hranjive podloge prikazane su u Tablici 1. U epruvete se izlijeva po 7 ml smjese, a zatim se epruvete stavljaju na sterilizaciju u autoklav 20 minuta na temperaturu od 121°C i tlak od 1,5 bara (Slika 2.,3.).

Tablica 4. Sastojci i količine sastojaka za pripremu hranjive podloge

Sastojak	**Količina (za 0,5 l podloge)**	
Agar	3,2 g	
Inositol	0,05 g	
Saharoza	15 g	
Makroelementi	50 ml	
Mikroelementi	0,5 ml	
Vitamini	0,5 ml	
Željezo (Fe)	2,5 ml	
IBA	0,05 mg	
BAP	1,0mg	2,5 mg



Slika 2. Priprema hranjive podloge (foto original; T. Kujundžić)



Slika 3. Punjenje i sterilizacija epruveta s hranjivom podlogom

(foto original; T. Kujundžić)

Izdvajanje i sterilizacija eksplantata

Izdvojene su vizualno zdrave lukovice ljutike koje su prethodno očišćeni. Lukovice su ispirane pod mlazom vode pet minuta. Nakon toga su lukovice stavljene jednu minutu u 70% etanola, a zatim 20 minuta u 20% varikinu kojoj je dodano nekoliko kapi deterdženta koji služi kao okvašivač. Nakon toga lukovice se ispirane autoklaviranom destiliranom vodom pet puta (Slika 5.).

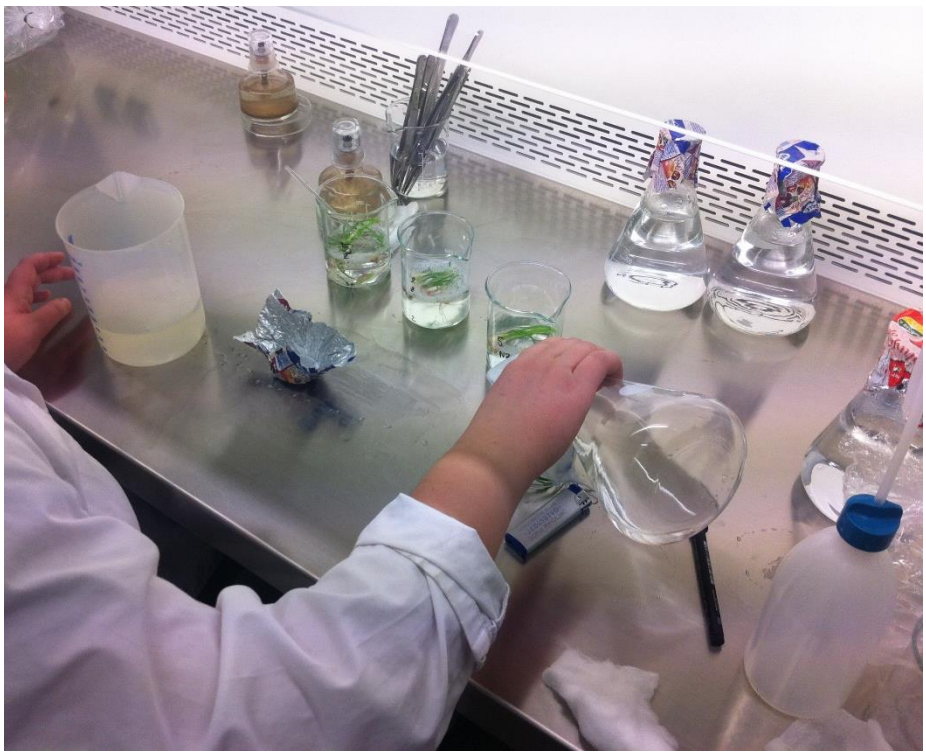


Slika 4. Odabir zdravih lukovica ljutike (foto original; T. Kujundžić)



Slika 5. Dezinfekcija lukovica, izdvajanje i definfekcija eksplantata ljutike (foto original; T. Kujundžić)

Pribor koji se koristio za fizičko izdvajanje eksplantata prethodno je prokuhan i očišćen sa 96% etanolom. Izdvajanje je obavljeno u laminaru u sterilnim uvjetima. Kao eksplantati korišteni su dijelovi klice lukovica ljutike. Izdvajanje klica je obavljeno pomoću laboratorijskog nožića i pincete u Petrijevim zdjelicama. Laboratorijski nožić i pinceta su za vrijeme izdvajanja sterilizirani ispiranjem u alkoholu i paljenjem na plameniku. Izdvojene klice su sterilizirane 10 minuta u varikini koju je dodano nekoliko kapi deterdženta (Slika. 5)



Slika 6. Uvođenje eksplantata ljutike u kulturu (foto original; T. Kujundžić)

Uvođenje u kulturu

Vidno zdrava ljutika je izdvojena, ukupno 60 eksplantata je uvedeno u kulturu te je stavljeno u hranjivu podlogu. 30 eksplantata je uvedeno u hranjivu otopinu koja je sadržavala 2,0 mg/L BAP te su stavljeni u klima komoru od čega je polovica eksplantata stavljena pod plavo svjetlo, a polovica pod bijelo svjetlo u tri ponavljanja. Preostalih 30 eksplantata uvedeno je u hranjivu podlogu koja je sadržavala 5 mg/L BAP od čega je također jedna polovica eksplantata stavljena pod plavo, a druga pod bijelo svjetlo. Temperatura u klima komori održavana je na ~23°C.

Rukovanje s eksplantatima prilikom uvođenja u kulturu provođeno je korištenjem sterilnog laboratorijskog pribora te se odvijalo u sterilnim uvjetima. Uvuđenje u kulturu se odvija na način da se pincetom svaki eksplantat uroni u hranjivu otopinu koja se nalazi u epruveti, bitno je plemenikom dezinficirati pincetu prilikom svakog novog eksplantata kako bi se smanjio postotak kontaminacije te se iz istog razloga na epruvetu stavlja i čep. (Slika 6, slika 7.).



Slika 7. Eksplantati ljutike pod bijelim svjetlom (foto original; T. Kujundžić)

Mjerenje i umnažanje materijala

Nakon dva tjedna uzorci su izvađeni iz klima komore te se mjerila duljina i masa biljaka nakob čega se biljni materijal umnažao. Prilikom mjerenja kontaminirani i bolesni eksplantati su uklonjeni. Duljina biljke je izmjerena je korištenjem papira s mjernom skalom, dok je masa biljaka određena laboratorijskom vagom. Prilikom mjerenja zabilježen je i multiplikacijski indeks,(broj novih eksplantata izdvojenih za slijedeće uvođenje u kulturu). Umnažanje je kao i u predhodnom uvođenju u kulturu obavljeno u sterilnim uvjetima sa sterilnim laboratorijskim priborom. Eksplantati su pincetom i nožićem podjeljeni na manje dijelove koji su zatim sterilizirani na jednak način kao i početni materijal te uvedeni u kulturu.

4. REZULTATI

Statistička obrada podataka napravljena je uz pomoć programa Poljoprivredna statistika VVStat (Vukadinović, 2013.). Razliku između tretmana ispitalo se dvofaktorijalnom analizom varijance ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Post hoc analiza je provedena pomoću LSD testa, pri čemu su razlike između razine pojedinačnih tretmana utvrđene pri razini značajnosti 95% ($p < 0,05$) i 99% ($p < 0,01$).

Statističkom obradom podataka dobiveni su sljedeći rezultati:
Najveća prosječna duljina ljutike u prvom ciklusu (80,03 mm), izmjerena je kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 5 mg/L BAP, a najmanja duljina (64,77 mm) kod tretmana plavim svjetlom uz koncentraciju hormona 2,0 mg/L BAP. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona na rast ljutike. Analizom nije utvrđen statistički značajan utjecaj spektra svjetlosti i interakcije svjetlost x hormon na duljinu ljutike (Tablica 5.).

Tablica 5. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na duljinu (mm) ljutike, I. ciklus

Varijanta tretiranja A/B	**2 mg/L (B1)**	**5 mg/L (B2)**	**Prosjek**
Plavo svjetlo (A1)	64,77	76,33	70,55
Bijelo svjetlo (A2)	66,93	80,03	73,48
Prosjek	65,85	78,18	72,017
LSD	**Svjetlo (A)**	**Konc. hormona (B)**	**Interakcije A x B**
0,01	n.s	5,574	ns
0,05	n.s	3,361	ns

Najveća prosječna duljina ljutike u drugom ciklusu (89,20 mm), izmjerena je kod tretmana plavim svjetlom uz koncentraciju hormona 2 mg/L BAP, a najmanja duljina (63,63 mm) kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 5,0 mg/L BAP. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona na rast ljutike. Analizom nije utvrđen statistički značajan utjecaj spektra svjetlosti i interakcije svjetlost x hormon na duljinu ljutike (Tablica 6.).

Tablica 6. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na duljinu (mm) ljutike II.ciklus

Varijanta tretiranja A/B	**2 mg/L (B1)**	**5 mg/L (B2)**	**Prosjek**
Plavo svjetlo (A1)	89,20	66,80	78,00
Bijelo svjetlo (A2)	80,23	63,63	71,93
Prosjek	84,72	65,22	74,967
LSD	**Svjetlo (A)**	**Konc. hormona (B)**	**Interakcije A x B**
0,01	ns	14,324	ns
0,05	ns	8,637	ns

Najveća prosječna masa ljutike u prvom ciklusu (0,713 g), izmjerena je kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 5 mg/L BAP, a najmanja masa (0,467 g) kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 2,0 mg/L BAP. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona, te je utvrđen statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) između interakcije svjetla s x koncentracija hormona na masu ljutike. Analizom nije utvrđen statistički značajan utjecaj spektra svjetlosti i interakcije svjetlost x hormon na duljinu ljutike (Tablica 7.).

U drugom ciklusu najveća prosječna masa ljutike (0,630 g), izmjerena je kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 2 mg/L BAP, a najmanja masa (0,437 g) kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 5,0 mg/L BAP. Analizom varijance

utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona, te je utvrđen statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) svjetla na masu ljutike. Analizom nije utvrđen statistički značajan utjecaj interakcije svjetlost x hormon na duljinu ljutike (Tablica 8.).

Tablica 7. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na masu ljutike (g), I. ciklus

Varijanta tretiranja A/B	**2 mg/L (B1)**	**5 mg/L (B2)**	**Prosjek**
Plavo svjetlo (A1)	0,50	0,713	0,607
Bijelo svjetlo (A2)	0,467	0,573	0,520
Prosjek	0,483	0,643	0,5633
LSD	**Svjetlo (A)**	**Konc. hormona (B)**	**Interakcije A x B**
0,01	ns	0,0783	ns
0,05	ns	0,0472	0,1042

Tablica 8. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na masu ljutike, (g) II. ciklus

Varijanta tretiranja A/B	**2 mg/L (B1)**	**5 mg/L (B2)**	**Prosjek**
Plavo svjetlo (A1)	0,593	0,430	0,512
Bijelo svjetlo (A2)	0,630	0,437	0,533
Prosjek	0,612	0,433	0,5225
LSD	**Svjetlo (A)**	**Konc. hormona (B)**	**Interakcije A x B**
0,01	ns	0,0287	ns
0,05	0,1444	0,0173	ns

Prosječni indeks multiplikacije ljutike iznosio je 3,4133. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona, te je utvrđen statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) između interakcije svjetlost x hormon na indeks multiplikacije ljutike. Analizom nije utvrđen statistički značajan utjecaj koncentracije hormona na indeks multiplikacije (Tablica 9).

Tablica 9. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na multiplikacijski indeks ljutike

Varijanta tretiranja A/B	**2 mg/L (B1)**	**5 mg/L (B2)**	**Prosjek**
Plavo svjetlo (A1)	2,887	3,663	3,275
Bijelo svjetlo (A2)	3,773	3,330	3,552
Prosjek	3,330	3,497	3,4133
LSD	**Svjetlo (A)**	**Konc. hormona (B)**	**Interakcije A x B**
0,01	0,5542	ns	ns
0,05	0,2403	ns	0,4830

5. RASPRAVA

Koncentracija hormona je pokazala statistički značajnu razliku kod parametara mase i duljine kod oba ciklusa. Kod multiplikacijskog indeksa, koncentracija hormona nije utjecala na statistički značajnu razliku. A za svjetlost je zabilježena statistički značajna razlika kod multiplikacijskog indeksa te kod drugog ciklusa multiplikacije.

Prema istraživanju autora Hailekidan i sur. (2013.) koji su kao pokusni materijal upotrijebljavali dvije lokalne sorte (Huruta i Minjar) u Murashige i Skoog mediju koji je bio dopunjen različitim koncentracijama i kombinacijama 2,4-diklorofenoksioctene kiseline, 6-benzilaminopurina, kinetina i α-naftalen octene kiseline za indukciju i regeneraciju biljaka. Ističu da je maksimalna indukcija kalusa zabilježena je u genotipu Huruta (81,11%) u mediju dopunjenim s 1 mg/1 2, 4-diklorofenoksioctene kiseline. U kombiniranom učinku, i Huruta i Minjar su pokazali najveću indukciju kalusa (74,44%) bazalnih diskova smještenih u mediju dopunjenom s 1 mg/l 2,4-diklorofenoksioctene kiseline. Među različitim tipovima i kombinacijama regulatora rasta, maksimalna težina kalusa od 1,26 i 1,20 g postignuta je s 1 mg/l 2, 4-diklorofenoksioctene kiseline i α-naftalenacetatnom kiselinom kombiniranom sa 1 mg/l 6-benzilaminopurina. Murashige i Skoog medij nadopunjen s 5.0 mg/l 6-benzilaminopurin + 0.1 mg/l α-naftalen octene kiseline pokazali su veći postotak regeneracije (91.11%). Dodatak 1,5 mg/l indol-3-maslačna kiselina + 2 mg/l 6-benzilaminopurin se pokazalo kao optimalna koncentracija kojom se dobiva 86,66% ukorijenjenih biljaka.

Autori Kapusta i Gorecka (2010.) ističu da je najbolji medij za uzgoj mikropropagiranih biljke bio je MS medij dopunjen s 0,5 mg / l^{-1} 2iP i 0,1 mg / l^{-1} NAA, dok Berljak i Benedicic (1996.) ističu da se dodavanjem 0,6 μM IAA povećava prosječan broj izbojaka po eksplantatu. Vega i sur., (2015.) ukazuju da su najbolji rezultati za regeneraciju biljaka (68% učinkovitosti) zabilježeni sa medijom MS uz dodatak 30g l^{-1} saharoze, 1,5g l^{-1} –benomila, 1,1μM NAA i 8,9μM BAP-a te za regeneraciju (77% učinkovitosti) s MS medijem uz dodatak 10μM anciminidom i 50g l^{-1} saharoze. Autori ističu da se razvijeni i standardizirani protokol u ovom istraživanju može koristiti za povećanje učinkovitosti proizvodnje lukovica za komercijalnu primjenu.

Afshari i sur., (2011.) su opisivali učinke zimskih i proljetnih genotipova repice (*Brassica napus* L.) ("PF7045 / 91, Okapi i Opera"), eksplantata (kotiledona i hipokotila), svjetlosti, različitih vrsta i koncentracija auksina (NAA i 2,4-diklorofenoksioctena kiselina 2,4-D), prisustvo citokinina (BA) i različite koncentracije mikro i makro elemenata (MS i ½ MS). Eklplantati su uzgajani u različitim kombinacijama medija i regulatora rasta biljaka, te su bili podvrgnuti različitim kombinacijama svjetlosti (u mraku ili svjetlu po 10 dana). Nakon 10 dana mjerana je težina ekplantata i formiranje korijena. Rezultati pokazuju da su 2,4-D u kombinaciji s citokinomima (BA), uzrokovali brže i bolje stvaranje kalusa i samu podjela stanica, dok je NAA (s BA ili bez njega) utjecala na težinu kalusa, ne samo u individualnim tretmanima, nego i u različitim kombinacijama, stimuliranjem stvaranja korijena i rizoma. Svjetlo je imalo statistički značajnog utjecaja na svježu masu kod kotiledona i hipokotila.

Kako bi se došlo do konkretnijih i preciznijih spoznaja, potrebno je istraživanje ponoviti.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih laboratorijskih istraživanja možemo zaključiti:

- Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona na rast ljutike u prvom ciklusu.
- Najveća prosječna duljina ljutike u prvom ciklusu (80,03 mm), izmjerena je kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 5 mg/L BAP.
- Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona, te je utvrđen statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) između interakcije svjetla s x koncentracija hormona na masu ljutike u prvom ciklusu
- Najveća prosječna masa ljutike u prvom ciklusu (0,713 g), izmjerena je kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 5 mg/L BAP

- Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona na rast ljutike. u drugom ciklusu
- Najveća prosječna duljina ljutike u drugom ciklusu (89,20 mm), izmjerena je kod tretmana plavim svjetlom uz koncentraciju hormona 2 mg/L BAP.
- U drugom ciklusu najveća prosječna masa ljutike (0,630 g), izmjerena je kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 2 mg/L BAP.
- Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona, te je utvrđen statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) svjetla na masu ljutike.

- Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona, te je utvrđen statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) između interakcije svjetlost x hormon na indeks multiplikacije ljutike. Prosječni indeks multiplikacije ljutike iznosio je 3,4133.

7. POPIS LITERATURE

Adeniyi, B., Anyiam, F. (2004.) *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* potential of methanol extract of *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae) leaf: susceptibility and effect on urease activity. Phytother Res 18: 358-361.

Afshari, R., Angoshtari, R., Kalantari, S. (2011.). Effects of Light and Different Plant Growth Regulators on Induction of Callus Growth in Rapeseed ('*Brassica napus* L.') Genotypes. *Plant Omics*, *4*(2), 60.

Berljak, J., Benedicic, D. (1996.). In vitro multiplication and propagation of a Slovenian selection of shallot (Allium ascalonicum L. cv. Pohorka). In *III International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 447* (pp. 119-120).

Bohanec, B. (2002.) Doubled – haploid onions. Allium crop science: (eds H.D. Rabinowitch and L. Currah) 145-158.

Briggs, W. R., Onley, M. A. (2001.): Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin and one superchrome. Plant Physiol., 94:448-454.

Eady, CC., Kamoi, T., Kato, M., Porter, NG., Davis, S., Shaw, M., Kamoi, A., Imai, S. (2008.) Silencing Onion Lachrymatory Factor Synthase Causes a Significant Change in the Sulfur Secondary Metabolite Profile. Plant Physiol 147: 2096-2106.

Fletcher P. J., Fletcher, J. D., Lewthwaite, S. L. (1998.) In vitro elimination of onion yellow dwarf and shallot latent viruses in shallots *(Allium cepa var. ascalonicum* L.), New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 26:1, 23-26, DOI:10.1080/01140671.1998.9514035.

Friesen, N., Fritsch, R., Blattner, F. (2006.) Phylogeny and new infrageneric classification of *Allium* (*Alliaceae*) based on nuclear ITS sequences. Aliso 22: 372-395.

Fritsch, R., Friesen, N. (2002.) Evolution, Domestication and Taxonomy in Rabinowitch, H.D., Currah, L. eds., Allium Crop Science: Recent Advances. CABI Publishing: 5-30.

Hailekidan, B., Andargie, M., & Assefa, K. (2013.). *In Vitro* Plantlet Regeneration from the Bulbs of Shallot (*Allium Cepa Var. Group Aggregatum)*. *Research in Plant Sciences*, *1*(2), 45-52.

Hidayat, I.M. (2005.). In vitro plant regeneration and bulblet formation of shallots (*allium ascalonicum* l.) ´sumenep´. Acta Hortic. 688, 251-258 DOI: 10.17660/actahortic.2005.688.34.

Jain, S., Ishii, K. (2003.): Micropropagation of woody trees and fruits. Chapter I: Effects of light quality on micropropagation of woody species. Kluwer academic publishers, Netherlands.

Kamenetsky, R., Rabinowitch, H. (2006.) The Genus *Allium*: A Developmental and Horticultural Analysis. Hortic Rev 32: 329-337.

Kapusta, E., Górecka, K. "Mikrorozmnażanie odmian miejscowych szalotki (Allium cepa L. var. aggregatum G. Don)-badania wstępne." *Nowości Warzywnicze* 51 (2010).

Kenel, F., Eady, C., Brinch, S. (2010.) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum*) immature leaf tissue. Plant Cell Rep 29: 223-230.

Leelarungrayub, N., Rattanapanone, V., Chanarat, N., Gebicki J. (2006.) Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. Nutrition 22: 266-274.

Le Guen-Le Saos, F., Hourmant, A., Esnault, F., Chauvin, J. E. (2002.). In vitro bulb development in shallot (Allium cepa L. Aggregatum Group): effects of anti-gibberellins, sucrose and light. *Annals of botany*, *89*(4), 419-425.

Linsmaier, E., Skoog, F. (1965.) Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant., 18(1):100 – 127.

Mahmoudabadi, AZ., Nasery, MKG. (2009.) Anti fungal activity of shallot, *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae), *in vitro*. J Med Plants Res 3: 450-453.

Mohamed-Yasseen, Y., Splittstoesser, W.E., Litz, R.E. Plant Cell Tiss Organ Cult (1994.) 36: 243. doi:10.1007/BF00037726.

Murovec, J., Bohanec, B. (2012.) Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: Abdurakhmonov, I. ed. Plant Breeding, Chapter 5: 87-106.

Novak, FJ. (1980.) Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. Z Pflanzenzuchtung 84: 250-260.

Parađiković, N. (2009.) Opće i specijalno ovrćarstvo. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 2009.

Park, M. Y., Yi, N. R., Lee, H. Y., Kim, S. T., Kim, M., Park, J. H., ... Choi, Y. D. (2002.). Generation of chlorsulfuron-resistant transgenic garlic plants (Allium sativum L.) by particle bombardment. Molecular Breeding, 9(3), 171-181. DOI: 10.1023/A:1019702705996.

Peterson, J. (2000.). The Allium Species (Onions, Garlic, Leeks, Chives, and Shallots). In K. Kiple & K. Ornelas (Eds.), *The Cambridge World History of Food* (pp. 249-271). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CHOL9780521402149.028

Rajapakse, N. C., Shahak, Y. (2007.): Light quality manipulation by horticulture industry. In: Whitelam, G. C., Halliday, K. J. (eds.), Light and Plant Development. Oxford, Blackwell Publishing: 290-312.

Reuveni, M., Evenor, D. (2007.): On the effect of light on shoot regeneration in petunia. Plant Cell Tissue Organ Cult. 89(1):49-54.

Saraswathi, T., Sathiyamurthy, V. A., Tamilselvi, N. A., Harish, S. (2017.). Review on Aggregatum Onion (Allium cepa L. var. aggregatum Don.). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, *6*(4), 1649-1667.

Scotton, D. C., Benedito, V. A., De Molfetta, J. B., Rodrigues, B. I. F. P., Tulmann-Neto, A., Figueira, A. (2013.): Response of root explants to *in vitro* cultivation of marketable garlic cultivars. Horticultura Brasileira, 31:80-85.

Song, SI., Cheong, JJ., Choi, YD. (2007.) Onion, garlic and related species. Biotechnol Agric For 59: 415-433.

Vega, J., Arahana, V. S., De Lourdes Torres, M. (2015). Estandarización de un protocolo de regeneración de cebolla chalote (Allium cepa var. aggregatum) a partir de meristemas apicales. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, *7*(1).

Vinterhalter, D., Vinterhalter, B. (1996.): Kultura *in vitro* i mikropropagacija biljaka. Axial, Beograd.

Vukadinović, V. (2013.): Poljoprivredna statistika VVStat– računalni program za statističku obradu podataka. (http://ishranabilja.com.hr/kalkulatori.html)

Walkey, D., Webb, M. J. W., Bolland, C. J., Miller, A. "Production of virus-free garlic (Allium sativum L.) and shallot (A. ascalonicum L.) by meristem-tip culture," The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, vol. 62, pp. 211–220, 1987.

YongCho, C., JuYeon, S., ByoungRyong, J. (2007.). Development of micropropagation methods of shallot (Allium cepa var. ascalonicum Backer). *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, *25*(4), 322-327.

Zheng, SJ., Khrustaleva, L., Henken, B., Sofiari, E., Jacobsen, E., Kik, C., Krens, FA. (2001.) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. Mol Breeding 7: 101-115.

https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?101652

http://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Allium+cepa+ascalonicum

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=532ul

http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Shallot

http://www.uniprot.org/taxonomy/28911

8. SAŽETAK

Rod *Allium* L. obuhvaća oko 750 vrsta. Unutar roda Allium nalazi se vrsta *Allium cepa var. Ascalonicum* L. poznata kao i ljutika (shallot). Za navedenu vrstu koriste se sinonimi: *Allium cepa var. aggregatum* G.Don i *Allium cepa var. Ascalonicum* L. Ljutika ili luk kozjak, (*Allium ascalonicum*) potječe s područja današnje Palestine i raširena je gotovo po cijelom Orijentu i srednjoj Aziji. Od davnina se koristi u ishrani i u narodnoj medicini. Kao i ostale vrste roda *Allium* ekstrakt ove vrste ima jaku antioksidativnu aktivnost i antimikrobno djelovanje Dvogodišnja je biljaka, koja se samorazmnožavanjem može održati više godina na istom mjestu. Glavna razlika između luka i ljutike je ta što ljutika ima manje lukovice koje rastu na istoj stabljici te ih može biti od 3 do 20. Cilj istraživanja je bio utvrditi utjecaj osvjetljenja i različite koncentracije hormona na početni porast eksplantata ljutike *in vitro.* Za istraživanje su korištene dvije različite varijante hranjive podloge (2,0 mg/L BAP i 5 mg/L BAP) te dvije varijante osvjetljenja, bijelo svjetlo i plavo svjetlo. Nakon dva tjedna uzgoja u kulturi određeni su masa, duljina i multiplikacijski indeks. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona na rast ljutike u prvom ciklusu. Najveća prosječna duljina i masa ljutike u prvom ciklusu izmjerena je kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 5 mg/L BAP. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona na rast ljutike. u drugom ciklusu. Prosječni indeks multiplikacije ljutike iznosio je 3,4133.

Ključne riječi: ljutika, svjetlost, hormon, BAP, mikrorazmnožavnje

9. SUMMARY

Genus *Allium* L. embraces about 750 species. Within the genus *Allium* there is the species *Allium cepa var. Ascalonicum* L. Known as a Shallot. The synonym used for this species is *Allium cepa var. Aggregate* G.Don and *Allium cepa var. Ascalonicum* L. Shallot(*Allium ascalonicum* L.) is originates from the territory of today's Palestine and is spread almost throughout the Orient and Central Asia. Since ancient times it has been used in nutrition and in folk medicine. Like other Allium species, extract of shallot has strong antioxidant activity and antimicrobial activity. It is a two year plant, which can be sustained several years in the same place. The main difference between arch and anger is that the angel has fewer bulbs growing on the same stem and can range from 3 to 20.The aim of this study was to determine the influence of illumination and different hormone concentrations on the initial growth of in vitro excitement of the sting. Two different nutrient media variants (2.0 mg / L BAP and 5 mg / L BAP) were used for the study, and two variants of illumination, white light and blue light. After two weeks of cultivation, weight, length and multiplication index were determined. The variance analysis showed a statistically significant effect ($p < 0.01$) of the hormone concentration on the incidence of sputum in the first cycle. The highest mean length and mass of first-cycle heart rate was measured in white light with a 5 mg / L BAP hormone concentration. The variance analysis showed a statistically significant effect ($p < 0.01$) of the hormone concentration on the incidence of sputum. In the second cycle. The average multiplication index of anger was 3.4133.

Key words: shallot, hormone, BAP, micropropagation

10. POPIS TABLICA

1. Tablica 1. Taksonomska klasifikacija prema (ITIS bazi) str.2

2. Tablica 2. Prema „U.S national plant germplasm system“, imena ljutike u svijetu str.3

3. Tablica 3. Nutritivna vrijednost ljutike prema Saraswathi i sur., (2017.) str.4

4. Tablica 4. Sastojci i količine sastojaka za pripremu hranjive podloge str.13

5. Tablica 5. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na duljinu (mm) ljutike, I. ponavljanje str. 18

6. Tablica 6. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na duljinu(mm) ljutike II.ponavljanje str. 19

7. Tablica 7. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na masu ljutike, I. ponavljanje str. 20

8. Tablica 8. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na masu ljutike, II. Ponavljanje str. 20

9. Tablica 9. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na multiplikacijski indeks ljutike str. 21

11. POPIS SLIKA

1. Slika 1 a), b), c). Sjeme, stabljika, lukovica *A. ascalonicum* str. 4

2. Slika 2. Priprema hranjive podloge str. 14

3. Slika 3. Punjenje i sterilizacija epruveta s hranjivom podlogom str. 14

4. Slika 4. Odabir zdravih lukovica ljutike str. 15

5. Slika 5. Dezinfekcija lukovica, izdvajanje i definfekcija eksplantata ljutike str. 15

6. Slika 6. Uvođenje eksplantata ljutike u kulturu str. 16

7. Slika 7. Eksplantati ljutike pod bijelim svjetlom str.17

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Utjecaj svjetla te koncentracije hormona na rast ljutike (*Allium ascalonicum* L.) *in vitro*

Toni Kujundžić

Sažetak: Rod Allium L. obuhvaća oko 750 vrsta. Unutar roda Allium nalazi se vrsta Allium cepa var. Ascalonicum L. poznata kao i ljutika (shallot). Za navedenu vrstu koriste se sinonimi: Allium cepa var. aggregatum G.Don i Allium cepa var. Ascalonicum L. Ljutika ili luk kozjak, (Allium ascalonicum) potječe s područja današnje Palestine i raširena je gotovo po cijelom Orijentu i srednjoj Aziji. Od davnina se koristi u ishrani i u narodnoj medicini. Kao i ostale vrste roda Allium ekstrakt ove vrste ima jaku antioksidativnu aktivnost i antimikrobno djelovanje Dvogodišnja je biljaka, koja se samorazmnožavanjem može održati više godina na istom mjestu. Glavna razlika između luka i ljutike je ta što ljutika ima manje lukovice koje rastu na istoj stabljici te ih može biti od 3 do 20. Cilj istraživanja je bio utvrditi utjecaj osvjetljenja i različite koncentracije hormona na početni porast eksplantata ljutike in vitro. Za istraživanje su korištene dvije različite varijante hranjive podloge (2,0 mg/L BAP i 5 mg/L BAP) te dvije varijante osvjetljenja, bijelo svjetlo i plavo svjetlo. Nakon dva tjedna uzgoja u kulturi određeni su masa, duljina i multiplikacijski indeks. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona na rast ljutike u prvom ciklusu. Najveća prosječna duljina i masa ljutike u prvom ciklusu izmjerena je kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 5 mg/L BAP. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) koncentracije hormona na rast ljutike. u drugom ciklusu. Prosječni indeks multiplikacije ljutike iznosio je 3,4133.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: prof.dr.sc. Nada Parađiković
Broj stranica: 32
Broj grafikona i slika:7
Broj tablica:9
Broj literaturnih navoda: 41
Broj priloga: -
Jezik izvornika: Hrvatski
Ključne riječi: ljutika, svjetlost, hormon, BAP, mikrorazmnožavnje
Datum obrane:
Stručno povjerenstvo za obranu:
1. doc. dr. sc. Tomislav Vinković, predsjednik
2. prof. dr. sc. Nada Parađiković, mentor
3. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, član

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of Agriculture in Osijek
University Graduate Studies, Vegetable and flower growing

Influence of light and hormone concentration on *in vitro* growth of shallot (*Allium ascalonicum* L.)

Toni Kujundžić

Abstract: Genus *Allium* L. embraces about 750 species. Within the genus *Allium* there is the species *Allium cepa var. Ascalonicum* L. Known as a Shallot. The synonym used for this species is *Allium cepa var. Aggregate* G.Don and *Allium cepa var. Ascalonicum* L. Shallot(*Allium ascalonicum* L.) is originates from the territory of today's Palestine and is spread almost throughout the Orient and Central Asia. Since ancient times it has been used in nutrition and in folk medicine. Like other Allium species, extract of shallot has strong antioxidant activity and antimicrobial activity. It is a two year plant, which can be sustained several years in the same place. The main difference between arch and anger is that the angel has fewer bulbs growing on the same stem and can range from 3 to 20.The aim of this study was to determine the influence of illumination and different hormone concentrations on the initial growth of in vitro excitement of the sting. Two different nutrient media variants (2.0 mg / L BAP and 5 mg / L BAP) were used for the study, and two variants of illumination, white light and blue light. After two weeks of cultivation, weight, length and multiplication index were determined. The variance analysis showed a statistically significant effect ($p < 0.01$) of the hormone concentration on the incidence of sputum in the first cycle. The highest mean length and mass of first-cycle heart rate was measured in white light with a 5 mg/L BAP hormone concentration. The variance analysis showed a statistically significant effect ($p < 0.01$) of the hormone concentration on the incidence of sputum. In the second cycle. The average multiplication index was 3,4133.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Nada Parađiković
Number of pages: 32
Number of figures:7
Number of tables: 9
Number of references: 41
Number of appendices: -
Original in: Croatian
Key words: shallot, hormone, BAP, micropropagation
Thesis defended on date:
Reviewers:

1. doc. dr. sc. Tomislav Vinković chairman
2. prof. dr. sc. Nada Parađiković, mentor
3. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, member

Thesis deposited at: Library Faculty of Agriculture in Osijek, Vladimira Preloga 1