

Utjecaj sortne specifičnosti i ravnoteže hormona u hranjivoj podlozi mikropropagacije borovnice

Glavan, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:461596>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-30**



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](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivan Glavan, apsolvant

Diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**UTJECAJ SORTNE SPECIFIČNOSTI I RAVNOTEŽE HORMONA U MEDIJU
NA UČINKOVITOST MIKROPROPAGACIJE BOROVNICE**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivan Glavan, apsolvant

Diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**UTJECAJ SORTNE SPECIFIČNOSTI I RAVNOTEŽE HORMONA U MEDIJU
NA UČINKOVITOST MIKROPROPAGACIJE BOROVNICE**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Vladimir Jukić, predsjednik
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor
3. doc.dr.sc. Monika Marković, član

Osijek, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Povijest uzgoja borovnice (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	3
2.2. Proizvodnja borovnice u svijetu	4
2.3. Proizvodnja borovnice u Hrvatskoj	6
2.4. Zdravstveni benefiti borovnice	7
2.5. Sistematika borovnice	8
2.6. Morfologija, biologija i ekologija borovnice	11
2.6.1. Korijen borovnice	11
2.6.2. Stablo-izdanak borovnice	12
2.6.3. Listovi	13
2.6.4. Cvijet	14
2.6.5. Plod	15
2.7. Razmnožavanje borovnice	17
2.7.1. Razmnožavanje borovnice zelenim izdancima	17
2.7.2. Razmnožavanje borovnice zrelim reznicama	18
2.7.3. Razmnožavanje borovnica korjenovim izdancima	19
2.7.4. Razmnožavanje borovnice mikropropagacijom	19
2.8. Dosadašnja istraživanja mikropropagacije borovnice in vitro	25
3. MATERIJALI I METODE	28
3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija za kulturu tkiva	28
3.2. Biljni materijal – sortiment u pokusu	29
3.3. Opis pokusa i tretmani u istraživanju	31
3.3.1. Wood Plant Medij (WPM)	33
3.3.2. Zeatin	33
3.4. Mjerenja u istraživanju	34
3.5. Obrada dobivenih podataka	35
4. REZULTATI	36
4.1. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Bluecrop	36
4.2. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Duke	37
4.3. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Legacy	39
4.4. Rezultati sortnih razlika između promatranih parametara po tretmanima 0.5 i 2* ml/l	40

5. RASPRAVA	42
6. ZAKLJUČAK	47
7. LITERATURA.....	49
8. SAŽETAK	62
9. SUMMARY	63
10. POPIS TABLICA.....	64
11. POPIS SLIKA	65
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	68
BASIC DOCUMENTATION CARD	69

1. UVOD

Borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) predstavlja voćnu kultura koja je u RH po svojoj intenzivnoj proizvodnji zanemariva i relativno je nova intenzivna kultura. Uslijed politike mjera ruralnog razvoja, odnosno poticaja od strane EU i RH putem europskih fondova posljednjih godina izražen je veliki interes domaćih poljoprivrednih gospodarstava za ovom kulturom te se bilježi rast nasada pod borovnicom, osobito kod mladih proizvođača. Kako je situacija s jezgričavim i koštičavim voćem u našoj zemlji katastrofalna po pitanju skladišnih kapaciteta i otkupne cijene, odnosno interesa ministarstva poljoprivrede, a samim time i države, mlađi naraštaji novih budućih i sadašnjih proizvođača okreću se cjenovno atraktivnijim kulturama među kojima je i borovnica.

Uslijed navedenog pojavila se i potreba proizvođača i rasadničara za kvalitetnim zdravim i certificiranim sadnim materijalom visoke kvalitete. Nije poznato koliko se u RH proizvede sadnog materijala tehnikom *in vitro* jer je zastupljenost takvih ustanova, odnosno akreditiranih laboratorija u našoj zemlji vrlo mala i može se nabrojati na prste jedne ruke. Većina sadnog materijala borovnice na našem tržištu potječe iz drugih država članica EU ili sivog tržišta gdje je takav materijal vrlo upitne kvalitete i sorte čistoće.

Moderna rasadničarska praksa razvijenih članica Europske unije u proizvodnji sadnog materijala temelji se dijelom ili u potpunosti na uporabi suvremenih biotehnoloških metoda (mikropropagacija, kultura tkiva *in vitro*). Mikropropagacija osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog sadnog materijala u kratkom vremenskom intervalu jer se proizvodnja odvija u kontroliranim i aseptičnim uvjetima. Glavne prednosti navedene tehnologije su mala količina potrebnog inicijalnog biljnog materijala zbog čega se ne moraju formirati veliki matičnjaci, a koeficijent multiplikacije je visok. Također, ne postoji ovisnost od godišnjih doba, a ušteda na prostoru i vremenu potrebnom za uzgoj je značajna.

Podizanje razine tehnoloških procesa uvođenjem navedene tehnologije u rasadničarsku praksu naše zemlje nameće se kao imperativ koji je potrebno ostvariti u suradnji s domaćim znanstvenim institucijama.

Upravo iz gore navedenih razloga krenulo se u pisanje ovoga diplomskog rada. Istraživanje je provedeno na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Katedra za voćarstvo,

vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* - laboratorij za voćarstvo) u cilju ispitivanja mogućnosti mikropropagacije borovnice tehnikom *in vitro* na polukrutom mediju. Kako se Katedra vrlo intenzivno bavi ovom tehnikom razmnožavanja vrlo velikog broja voćnih kultura, cijelo istraživanje je provedeno vrlo detaljno i u skladu s visokim standardima i normama koje nameće *in vitro* model razmnožavanja voćnih kultura. U ovom istraživanju uspoređivan je utjecaja određenih koncentracija hormona zeatina koji se po recentnim navodima nameće kao vrlo učinkoviti citokinin u mikropropagaciji borovnice na uspješnost multiplikacije i morfološke karakteristike 3 privredno značajna kultivara visokogrmolike borovnice (Duke, Bluecrop i Legacy).

U prvom dijelu rada detaljno je opisana borovnica – od porijekla, biološke klasifikacije, nutricionizma, ljekovitih svojstava, trenda proizvodnje, morfoloških karakteristika i načina razmnožavanja s posebnim osvrtom na *in vitro* model. U poglavlju materijali i metode nalazi se iscrpno opisano postavljanje samog modela pokusa, sortimenta u pokusu, korištenih tretmana, promatranih parametra i načina obrade dobivenih podataka. Na kraju rada nakon opsežnih rezultata i rasprave donesen je zaključak o vrlo uspješnom pokusu i mogućnosti mikropropagacije visokogrmolike borovnice ovom tehnikom te mogućih budućih smjerova istraživanja ove tematike na borovnici.

2. PREGLED LITERATURE

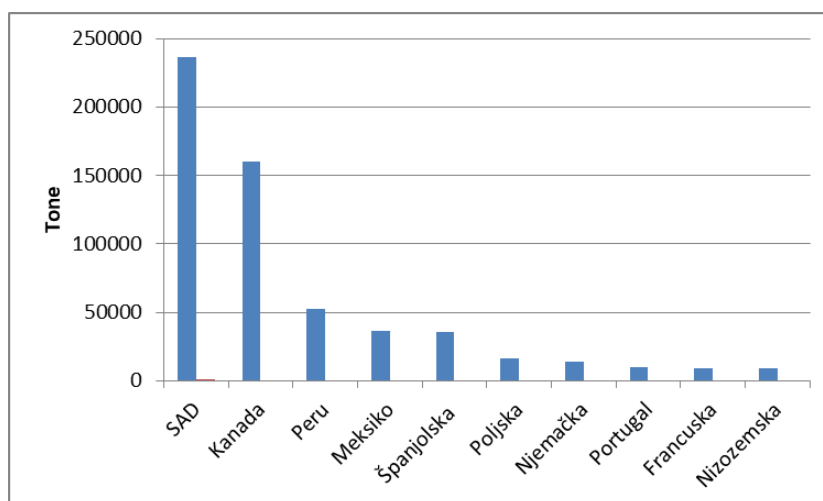
2.1. Povijest uzgoja borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.)

Prije početka komercijalnog uzgoja borovnice američki domoroci su ju vrlo cijenili i upotrebljavali radi pozitivnog učinka na zdravlje. Upotrebljavali su je kako svježu tako i konzerviranu (suhu) kao zalihu za zimski period. Osušene bobice upotrebljavali bi za razna variva i juhe te kao sastojak pri pripremi mesnih jela. Posebno valja istaknuti i puding zvan Sautauthig koji se pravio u kombinaciji s borovnicom, mesom, vodom, medom i kukuruznim brašnom. Lišće borovnice koristili su za pripremu čaja koji je pozitivno djelovao na krvnu sliku. Mnogi stariji istraživači američkog kontinenta također su zabilježili domorodačku upotrebu borovnica i u istočnom SAD-u. Tu aktivnost prvi primjećuje i zapisuje osnivač Quebeca, Samuel de Champlain 1615. godine (Thoreau, Dean, 2000.). U svojim spisima opisuje kako su žene iz plemena Algonquin sušile borovnice na suncu. Upotrebu konzerviranih borovnica tijekom zime nazvao je zimska mana. Osim njega, domorodačku upotrebu borovnica opisali su i engleski protestanski teolog Roger Williams 1693. godine i botaničar John Bartram 1738. godine (Hummer, 2013.). Williams je u svojim spisima opisao konzerviranje borovnica sušenjem i zatim mljevenje u prah. Od tako pripremljenih borovnica američki bi domoroci pripremali jela koja su zvali Sautaash i Sautauthig koja su bila slatkog okusa. Williams ih je usporedio s okusom šljive i začinske torte u Engleskoj (Thoreau, Dean, 2000.). Prvi doseljenici su u zimu 1620. godine osnovali koloniju u Plimothu. Smrtnost prvih doseljenika bila je velika, a oni koji su preživjeli počeli su graditi kuće i podizati farme. Susjedi su im bili Wampanoag Indijanci koji su im velikodušno prenijeli svoja znanja uzgoja raznih usjeva između kojih i borovnice. Vremenom je borovnica postala važan izvor hrane. Tijekom građanskog rata počinje velika uporaba pića na bazi borovnice. Početak ozbiljnije prerađevine počinje 1880. godine osnivanjem industrije u konzerviranju borovnice na sjeveroistoku SAD-a. Prijelomna godina za uzgoj borovnice bila je 1916. Upravo te godine Elizabeth Coleman White je proizvela prvu komercijalnu sortu borovnice. Prije te godine uzgajala se samo divlja borovnica koja je nedostižna kako prema kvaliteti tako i prema kvantiteti u usporedbi s kultiviranim sortama. Suradnik joj je bio botaničar Frederick A. Coville. 1911. godine Elizabeth C. White se udružila s botaničarom Frederickom Covilleom u svrhu identificiranja divljih borovnica s najboljim karakteristikama, nakon čega su iste križali i

dobili prve komercijalne sorte borovnice. Prva berba tih sorti zbila se 1916. godine u New Jerseyu. Botaničar Frederick Coville je 1908.g. ukazao je na nisku pH vrijednost zemljišta (pH 4,5-4,8) kao pogodnu za uzgoj borovnice. Osim toga, ukazao je još i na samoneoplodnost borovnice i potrebu za sortama oprašivačima u uzgoju. Osmislio je i način razmnožavanja elitnih klonova koja omogućuje proizvodnju velikog broja identičnih biljaka što je potrebno za komercijalnu proizvodnju. Prije toga se smatralo da se borovnica ne može na taj način razmnožavati. 1911. g. uspješno je križao dvije vrste divlje borovnice superiornih karakteristika, jednu visokogrmoliku, a drugu niskogrmoliku te ih nazvao Brooks i Russel. Križanja su se nastavila te su bila uspješna što govori podatak da je između 1911.g. i 1913.g. proizveo 3000 hibrida. Osim tih križanja vrlo uspješno su se pokazala križanja između već spomenute Brooks i divlje borovnice nazvane Soy. Ta križanja provedena su 1912.g. i rezultirala su proizvodnjom drugih 3000 sjemenjaka. Prvi hibrid pušten na tržište bio je Pioneer koji je rezultat križanja Brooks x Soy. Nakon tog hibrida slijedila su još dva pod imenom Cabot i Katherine. Uloga Elizabeth C. White u svemu tome je bila vođenje rada oko prikupljanja i identificiranja divljih borovnica koje su upotrebljavane za oplemenjivanje. I nakon smrti Fredericka Covillea njegovi hibridi su izlazili na tržište, među kojima se treba izdvojiti Blueray, Bluecrop i Earlyblue koji se i danas koriste u visokom postotku u proizvodnji.

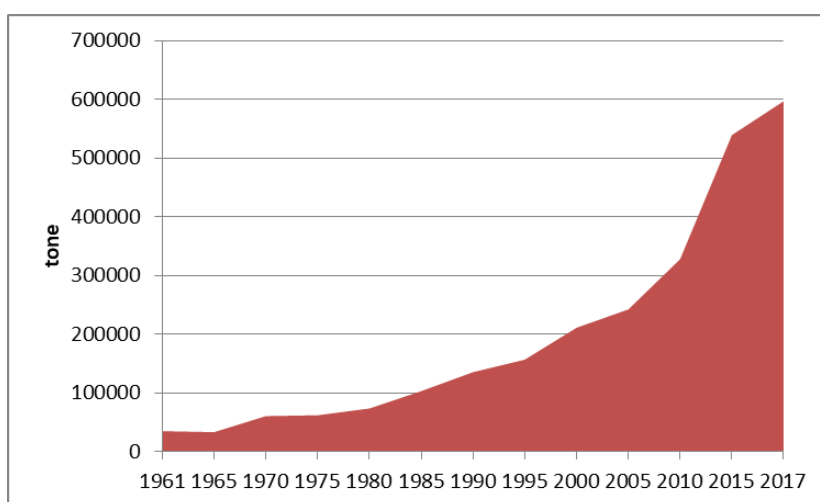
2.2. Proizvodnja borovnice u svijetu

Prema posljednjim dostupnim podacima, ukupna svjetska proizvodnja borovnice iznosi 596 813 tona ubranih na sveukupno 109 541 ha (FAOSTAT, 2017). Kao najveći svjetski proizvođači izdvajaju se SAD (236 621 t), Kanada (160 246 t), Peru (52 301 t), Meksiko (36 700 t) i Španjolska (35 355 t). SAD i Kanada su zemlje odakle i potječe borovnica i epicentar su komercijalnog uzgoja, pa nije ni čudno što te dvije zemlje zajedno proizvode 66% sveukupne svjetske proizvodnje (Grafikon 1.).



Grafikon 1. Top 10 svjetskih proizvođača borovnice na svijetu (*Izvor: FAOSTAT*)

Prvi dostupni podaci svjetske proizvodnje borovnice datiraju iz 1961. godine (Grafikon 2.). Iz tih podataka od tada do danas može se uočiti konstantan porast ukupne svjetske proizvodnje borovnice. Prva izmjerena količina 1961.g. iznosila je 35 091 t, a sljedeće analizirane godine 1965.g. proizvedeno je 33 416 t. To je usto i jedina godina s padom proizvodnje u analiziranom periodu (1961.-2017.). Posljednje analizirane 2017. godine proizvedeno je 596 813 tona. To je u odnosu na početnu analiziranu godinu povećanje proizvodnje za 1700%.



Grafikon 2. Kretanje svjetske proizvodnje borovnice u razdoblju 1961-2017. g.

(*Izvor: FAOSTAT*)

Ova voćna vrsta aktivno se uzgaja na šest kontinenata. U posljednje vrijeme sve više raste broj novih nasada diljem svijeta zbog sve naprednijeg sustava proizvodnje i napuštanja tradicionalnog načina uzgoja koji je bio mnogo u upotrebi prije 15 godina (Moore, 1994.).

Također diljem svijeta uvođenjem novih tehnologija u upotrebu se uvode i sve se više koriste perspektivne nove svjetske sorte, a napuštaju se one koje su se u prijašnjim vremenima tradicionalno koristile (Strik, 2007.).

U odnosu na 2015.g. svjetska potrošnja borovnice je porasla za 45% u 2016.g. To povećanje potražnje i potrošnje borovice je uzrokovano njenim odličnim zdravstvenim benefitima. Osim visoke razine antioksidansa, vitamina C i vlakana borovnica se ističe po svojoj visokoj razini antocijana što je i čini posebnom i tržišno privlačnom. Na europskom kontinentu borovica se uzgaja pretežito u sjevernim državama. Na tom kontinentu ova voćna vrsta je deficitarna pa se zbog toga uvoze velike količine kako bi se zasitilo tržište, a od uvoznika najviše prednjači Čile s godišnjom uvezenom količinom od 25 000 tona. Argentina se u posljednjih nekoliko godina razvila u jednu od najvećih ekspanzijskih proizvođača borovice. U usporedbi s 2015.g. proizvodnja je 2016. g porasla za 500%, a izvoz se povećao za 40%, od čega se najviše izvozi u Europu 47% ukupne proizvodnje (Escodo, 2018.).

Ekspanziji uzgoja borovnice svjedočimo i u JAR-u koja je prije pet godina proizvodila borovnicu na 500 ha dok joj je trenutna proizvodnja rasprostranjena na 1700 ha.

2.3. Proizvodnja borovnice u Hrvatskoj

Prema podacima iz 2013. g. površine pod borovnicom iznose 88.6 ha. Od sortimenta se koristi Bluecrop, Duke i Patriot. Iz tih podataka zaključuje se kako je proizvodnja borovnice u Hrvatskoj slaba i mizerna iako imamo povoljne uvjete i tlo koje stoji neiskorišteno. Rješenje u unaprjeđenju proizvodnje je poticanje podizanja novih plantaža, educiranje stanovnika s najnovijim dostignućima u uzgoju te uvođenje novih tržišno perspektivnih sorti (Duralija i sur., 2014.)

Samoniklo najviše raste u Gorskom kotaru i na Velebitu, a može se naći i na Medvednici, Ivanščici, Strahinjščici, Samoborskom gorju, Žumberku, Ličkoj Plješivici, Papuku i Psunju (Purgar Dujmović i sur., 2015).

2.4. Zdravstveni benefiti borovnice

Prvi spoznaje benefitnog utjecaja borovnice na zdravlje utvrđeni su kod europske borovnice (*V. myrtillus*) i to u srednjem vijeku kad se koristila kao lijek za mnoge bolesti. Istraživanja tijekom prošlog stoljeća na ovoj vrsti usmjerena su na dokazivanje utjecaja borovnice na krvožilni sustav i oftalmologiju. U posljednje vrijeme povećao se interes utjecaja borovnice na ljudsko zdravlje te se provode brojna istraživanja u raznim područjima poput oftalmologije, neuroznanosti, utjecaja na starenje itd. (Kalt i sur., 2007.). Borovnice su vrlo bogate spojevima fenola, točnije antocijanima koji im određuju okus i boju (Johnson i Arjmandi, 2013.). Njihova apsorpcija i biodostupnost variraju prema vrsti fenola, a te dvije karakteristike su najvažnije u borbi protiv karcinoma (Manach i sur., 2005; 2004.). Istraživanjima je dokazano da ti spojevi imaju vrlo visok antioksidativni učinak i biološku aktivnost (Ehlenfeldt i Prior. 2001; Kalt i sur., 2001; Sellappan, i sur., 2002.). Niskogrmolika borovnica u usporedbi s visokogrmolikom borovnicom (a i općenito u usporedbi s većinom konzumiranog voća) ima veći udio antocijana i općenito ukupnih fenolnih spojeva, odnosno i veći antioksidativni potencijal (Kalt i sur., 2001; Wolfe i sur., 2008.). Njen visok antioksidativni potencijal i bogatstvo fitokemijskih spojeva djeluju na oksidativni stres što znatno pomaže u prevenciji karcinoma (Johnson i Arjmandi, 2013.). Do sada se dokazalo kako karcinom između ostalog uzrokuju i kronične upale (Gupta i sur., 2010.), a borovnice sa svojim spojevima smanjuju upalne procese s tim da inhibiraju aktivnost nuklearne kape B (Boivin i sur., 2007; Xie , 2011.). Osim toga pokazalo se da konzumacija borovnica smanjuje produženje stanica raka kao i usmrćivanje stanica raka (Seeram i sur., 2006; Srivastava i sur. 2007; Yi i sur., 2005; Pan i sur., 2007.). U uvjetima *in vitro* je dokazano da borovnica povoljno utječe na smanjenje metastaza i angiogenetskog potencijala tumorskih stanica (Adams i sur., 2010; Roy i sur., 2002; Atalay i sur., 2003.).

2.5. Sistematika borovnice

Borovnica pripada rodu *Vaccinium* koji je dio porodice *Ericace*. Rod *Vaccinium* broji 471 vrstu visokogrmolikih borovnica prikupljenih u Sjevernoj Americi s 56 lokaliteta (Vander Kloet, 1980.). Od svih tih vrsta za komercijalnu proizvodnju se izdvajaju njih 18 koji su korišteni za stvaranje komercijalnih sorti. Od tih 18 najvažnije su 4 koje su direktno korištene u oplemenjivanju za dobivanje komercijalnih sorti, a to su: *Vaccinium corymbosum* (visokogrmolika borovnica), *Vaccinium angustifolium* (niskogrmolika borovnica), *Vaccinium australe* (jugoistočna grmolika borovnica) te *Vaccinium ashei* (borovnica zečje oko). Ostalih 14 vrsta koje nisu spomenute korištene su u složenim križanjima za stvaranje komercijalnih sorti (Šoškić, 2008.).

Vaccinium corymbosum

Ova vrsta borovnice je autohtona Sjevernoamerička biljka koja se najčešće nalazi u močvarnim područjima. Može biti visokog i niskog rasta. Osim u Sjevernoj Americi može se naći i u Europi, Kini, Južnoj Africi, Australiji i Novom Zelandu. Može narasti do 3.7 metara u visinu. Daje plavo crne plodove promjera do 12.7 mm. Tetraploidna je i kao takva je stranooplodna te treba oprašivača. Ova vrsta je često korištena od strane američkih indijanaca. Kasnije ju je koristio Frederick Coville u stvaranju komercijalnih sorti. Od nje su nastale sorte Bluecrop, Blu-ray, Duke i Patriot. Prema potrebi za inaktivnim temperaturama dijeli se na sjeverne i južne tipove (Retamales i Hancock, 2012.).



Slika 1. Nekultivirana visokogrmolika borovnica (Izvor: <https://garden.org>)

Vaccinium angustifolium

Ova vrsta borovnice je autohtona centralnoj i istočnoj Kanadi i sjeveroistoku SAD-a. Južna granica rasprostranjenosti su joj Great Smoky Mountains, a zapadna područje Velikih Jezera. Ova vrsta borovnice je patuljasti grm maksimalne visine 60 cm. Ova vrsta je otporna na vatru te se mogu naći velike površine pod ovom biljkom tamo gdje je područje bilo zahvaćeno vatrom. Općenito su joj povoljna šumovita područja s dobro dreniranim kiselim tlama.



Slika 2. Niskogrmolika borovnica (Izvor: <https://www.minnesotawildflowers.info>)

Vaccinium ashei

Ova vrsta borovnice je autohtona jugoistoku SAD-a (Teksas, Florida, Louisiana). Samoneoplodna je vrsta te su joj potrebna dvije ili više sorte za oplodnju. Za oplodnju ove vrste borovnice je nepovoljna medonosna pčela. Umjesto nje ovu vrstu oprašuje jugoistočna borovničina pčela *Habropoda laboriosa*. Vrlo je popularna vrsta, vjerovatno zbog svoje otpornosti na većinu značajnijih bolesti i štetnika. Plodonosi na vrhovima grana, jednogodišnjim izbojima koji su se razvili prethodne godine. Od sorti nastalih od ove vrste izdvajaju se Woodard, Tifblue, Briteblue, Clinax i Sharpblue,



Slika 3. Kultivirana borovnica zečje oko (Izvor: <http://petalsfromthepast.com/>)

Vaccinium australe

Ova vrsta je poznata i pod imenom *Vaccinium formosum* (Uttal,1986). Areal rasprostranjenja joj je istok SAD-a, točnije od New Jerseya do Floride i Alabame. Listopadni je grm koji može narasti do 4 m u visinu. Hermafrodit je, te se oprašuje insektima. Preferira osunčane položaje gdje stvara najkvalitetnije plodove, iako se može naći i na blago sjenovitim mjestima. Osjetljiva je i na jake vjetrove. Zbog kvalitetnih plodova, od ove vrste nastalo je dosta kultivirani sorti. Osim kvalitetnih plodova, prednost ove vrste je i otpornost na medne gljive. U bliskom je srodstvu s vrstom *Vaccinium corymbosum*.



Slika 4. *Vaccinium australe* (Izvor: <https://www.earth.com>)

2.6. Morfologija, biologija i ekologija borovnice

Borovnica je listopadna voćna vrsta koja raste u obliku grma. Listopadna je i može podnositi niske zimske temperature do -25°C , a ukoliko je pod snježnim pokrivačem može i više. Vrlo je plodonosna i po jednom grmu može dati i do 10 kilograma ploda. Preferira sunčane položaje.

Prema Miljkoviću (1991.) sve više biljke, a i voćne vrste koje im pripadaju, organe dijele na vegetativne koji služe za proizvodnju biljnih hranjivih tvari i za provođenje kroz biljku istih, te generativne koji služe za razmnožavanje. Vegetativni organi voćnih vrsta su korijen, korijenov vrat, deblo, grane, listovi i pupovi koji mogu biti lisni i drvni. Organi kojima se voćne vrste razmnožavaju nazivaju se generativni i dijele se na cvjetne ili cvatne pupove, cvijet, plod i sjeme.

2.6.1. Korijen borovnice

Korijen borovnice dijeli se na korijenje debljine olovke koje služi za pohranu hranjivih tvari i statiku biljke, te fino vlaknasto korijenje kojim biljka upija vodu i mineralne tvari iz tla (najčešće promjera $50\text{ }\mu\text{m}$). Anatomija starog korijenja je slična izdancima (Gough, 1993.).

Borovnica je voćna vrsta koja razvija fino vlaknasto korijenje bez korjenovih dlačica. Specifičnost ove voćne vrste je prisutnost erikoidne mikorize, tj. rijetke vrste asocijacije gljiva i korjenovog sustava biljke. Brzina rasta korijena varira kroz godinu, a vrhunac se javlja dva puta godišnje i to u svibnju i rujnu. Prema Bryla i Strik (2007.) glavina korjenove mase nalazi se na dubini od 15 cm kod petogodišnjih borovnica, a dubina dokle prodire vrh korijena je 55 cm. Cjelokupni volumen korijena borovnice kreće se od 0.24 cm^3 do 0.72 cm^3 , a prosječna težina suhog korijenja iznosi 1.7 kg (Gough, 1993.). Korijen najbolje raste i razvija se pri temperaturi u rasponu od $14-18^{\circ}\text{C}$, dok se na nižim temperaturama ispod 8°C usporava (Ebert, 2008.). Rast korijena počinje u proljeće kada temperature tla dostignu oko 6°C , te se ovi uvjeti često poklapaju sa fenofazom bubrenja pupoljaka na nadzemnom sustavu. Rast korijena se nastavlja do kraja proljeća, ali usporava za vrijeme perioda razvoja i sazrijevanja ploda. Većina rasta korijena se događa nakon berbe do jeseni sve dok temperature tla ne padnu ispod 7°C . Pokazalo se da borovnica koja

je uzgajana na gredicama proizvodi više korijenove mase u odnosu na uzgoj na ravnom tlu. Osim toga, istraživanja su pokazala i bolji razvoj korijena u širinu kod sustava navodnjavanja mikrorasprskivačima u odnosu na klasični sustav kap po kap gdje je korjenov sustav koncentriran na mjestu pod kapaljkama.



Slika 5. Korijen borovnice (Izvor: <https://www.growingproduce.com>)

2.6.2. Stablo-izdanak borovnice

Borovnica tvori stablo u obliku grma koji se sastoji od mnoštva izdanaka koji rastu iz pupova smještenih na korjenovu vratu (Gough, 1993.). Izdanci borovnice dijele se na 3 različita tipa: korjenovi izdanci koje se razvijaju iz pupova na korijenju; izdanci koji se razvijaju iz pupova koji su bili u stanju dormantnosti minimalno jednu godinu tzv. spavajućih pupova i lateralni izboji koji se razvijaju iz pupova na prošlogodišnjim izbojima. Izboji iz spavajućih pupova razvijaju se kasnije u vegetaciji, a njihovo kretanje je uvjetovano i rezidbom. Ovisno o sorti takvi tipovi izdanaka mogu se razvijati samo iz baznih dijelova stabljike, tj. isključivo iz viših dijelova. Prema starosti mogu biti mladice, grančice i grane. Vegetativni rast započinje u proljeće sa bubrenjem pupoljka. Prirasti rastu u intervalima koji se manifestiraju kao ubrzan rast, zatim se isti zaustavlja kako apikalni pupoljak abortira. Nakon toga, pupoljak blizu vrha mladice neće nastaviti rasti. Mladice

moгу imati jedan do nekoliko intervala rasta tokom sezone vegetacije. Sredinom ljeta rast prirasta usporava i nekoliko se pupoljaka duž novih mladica diferenciraju u cvjetne pupoljke koji će plodonositi sljedeće godine. Tijekom vegetacije događaju se brojne aborcije apikalnog vrha izbojka koji direktno utječu na rast izbojaka i zbog toga se on ne razvija konstantno kroz sezonu (Gough i sur. 1978.; Shutak i sur. 1980.).



Slika 6. Grm i izboji borovnice u zimskom mirovanju (Izvor: <https://www.growveg.com>)

2.6.3. Listovi

Lišće se nalazi na izbojcima i raspoređeno je naizmjenično. Duguljasti su i šiljasti s cjelovitim rubovima, ali neki kultivari razvijaju i lagano nazubljene listove. Masa pojedinog lista iznosi 0.4-0.5 g (Ebert, 2008.). Prema Gough i sur., (1976.) dužina listova može iznositi do 7.5 cm s dlakavim naličjem i nektarijama pri bazi listova. Broj listova ovisi o debljini izdanka, pa tako deset listova nose tanji izbojci, 20 srednje debeli, a 30 debeli izbojci (Gough i Shutak, 1978.). Veličina lista ovisi o mjestu gdje se nalazi, pa su tako listovi na sporednim mladicama veličine 5-6 cm, a ukoliko su na najsnažnijoj glavnoj mladici veličina im iznosi 10 cm. Tamnozeleno su boje. Puči se nalaze na naličju, a sama njihova gustoća kreće se oko 500-600/mm², što je identično kao i kod jabuke i ostalih

voćnih vrsta. Listovi su najrazvijeniji tijekom mjeseca lipnja. Da borovnica ne podnosi dobro sušne periode dokazuje i slab vodni potencijal samog lista koji je donekle i rezultat slabe učinkovitosti korijena. Iz tog zaključujemo da borovnica za svoj uzgoj zahtijeva ujednačenu vlažnost tla (Elbert, 2008.).



Slika 7. List borovnice (Izvor: <https://www.dreamstime.com>)

2.6.4. Cvijet

Diferencijacija cvjetnih pupoljaka odvija se u prethodnoj godini od kraja sedmog do početka devetog mjeseca. Za razliku od nekih drugih voćnih vrsta, kod borovnice diferencijacija cvjetova i samo sazrijevanje plodova ne događa se u isto vrijeme. Najviše cvjetnih pupova nalazi se pri vrhovima izbojaka, dok je njihov manji broj u donjim dijelovima grma.

Čimbenici koji utječu na inicijaciju cvjetnih pupova su intenzitet svjetla, opskrbljenost biljke ugljikohidratima te karakteristika sorte. Osim toga, inicijacija cvjetnih pupova je usko povezana s vegetativnim rastom koji se mora usporiti ili prekinuti da bi inicijacija cvjetnih pupoljak uopće krenula. To nam ukazuje kako su ove dvije pojave u korelaciji. Nakon što inicijacija završi, počinje diferencijacija cvjetova u cvjetnom pupu koja traje do kasnih zimskih mrazeva. Mraz prekida taj proces, te se diferencijacija nastavlja pred kraj zime ili početkom proljeća i traje sve do pred cvatnju.

Cvatnja borovnice počinje na sporednim izbojima prvog reda. Cvjetni je pup u odnosu na lisni veći i masivniji. Iz cvjetnog se pupa razvija cvat koji se sastoji od 12 cvjetova.

Posebnost nekih sorata je stvaranje više cvatova iz samo jednog pupa. Latinsko ime *corymbosum* borovnica je dobila zbog svoje cvati na kojoj donji cvjetovi imaju dulje stapke od onih gornjih i tako stvara oblik gronje koji se na latinski zove *Corymbus*. U našim klimatskim uvjetima, cvatnja borovnice odvija se tijekom prva dva tjedna svibnja, što je relativno kasno. Cvijet se sastoji od 5 međusobno sraslih latica ružičaste ili žućkastobijele boje, a nalazi se na cvjetnoj stapci dugoj 20 mm. Plodnica je okružena s 5 zelenih listova, a u njoj se nalazi do 80 sjemenih zametaka. Visokogrmolike borovnice su samooplodne, ali je poželjna stranooplodnja koja utječe na veću veličinu plodova i ranije sazrijevanje. Kako bi se što više sjemenih zametaka oplodilo i time povećali plodovi potrebno je osigurati i insekte oprašivače kao što su pčele ili bumbari. U praksi se pokazalo da se od sveukupnih cvjetova oplodi i razvije u plod tek njih 50-70%, a maksimalno 80%. Ukoliko nema prisutnosti insekata oprašivača, zametanje plodova smanjuje se za 20%. U praksi se kao oprašivač pokazao najbolji bumbar (Ebert, 2008.).



Slika 8. Cvat borovnice (Izvor: <https://en.wikipedia.org>)

2.6.5. Plod

Plod borovnice je mesnat i bez drvenastih vlakana (sjeme je iznimka) te je kao takav botanički gledano pravi plod. Na rast i razvoj ploda najviše utječu sortne karakteristike i vremenske prilike, a ovisno o njihovom utjecaju ti procesi traju od 8 do 16 tjedana (Ebert, 2008.).

Nakon oplodnje i zametanja plodovi prolaze kroz tri faze rasta: diobu stanica gdje se plod dosta povećava iako ostaje zelen, zatim razvoj embrija gdje se veličina ploda ne povećava, i

zadnja faza je povećanje stanica gdje se svaka stanica uvećava. Početak bojanja plodova počinje krajem druge faze razvoja ploda. U trećoj fazi rastu šećeri, a kiseline su u opadanju. Na težinu samih plodova utječu opterećenje grma, broj sjemenki u plodu, sorta i faza razvoja gdje se pokazalo da se plodovi intenzivno uvećaju nakon što potpuno dobiju plavu boju. Pokazalo se da na čvrstoću plodova utječu vrijeme, sorta i faza razvoja pri berbi.

Prilikom sazrijevanja na plodu se stvara i bjelkasti sloj voska koji ima zaštitnu ulogu. Iako se do nedavno smatralo da se rast ploda prekida u drugoj fazi razvoja, posljednja istraživanja pokazuju da je taj prekid kontinuirana pojava koja ovisi o abiotским čimbenicima. Istodobno nesazrijevanje plodova u direktnom je odnosu s brojem sjemenki u plodu koji reguliraju vrijeme zrenja. Kao što je već spomenuto, ova se negativnost u uzgoju znatno ublažava primjenom insekata oprašivača u uzgoju. Tijekom prve berbe zreli su samo najveći plodovi, a u kasnijim berbama veličina plodova je znatno manja. Pošto je borovnica klimakterično voće, tretiranje etilenom moglo bi ubrzati sazrijevanje plodova i skratiti berbu. Treba istaknuti i činjenicu kao se tijekom treće faze razvoja ploda, odnosno prilikom opadanja kiselina za 0,1% povećava sadržaj šećera za 1%. Rezultat navednog povezan je s mekoćom ploda i postotkom obojenja plodova. Meso američke borovnice je bezbojno pa se prema tome zaključuje da su svi biljni pigmenti tj. antocijani sadržani u pokožici ploda. Borovnica ima laku sklonost prema alternativnoj rodnosti, kako kultivirane sorte tako i divlje (Ebert, 2008.).



Slika 9. Plod borovnice (Izvor: <https://es.dhgate.com>)

2.7. Razmnožavanje borovnice

Borovnica se najčešće razmnožava pomoću korjenovih izdanaka, zrelih i zelenih reznica te kulturom tkiva. Drugi načini razmnožavanja se također koriste, ali u manjoj mjeri te zbog toga ovdje neće biti spomenuti. Ukoliko osoba već ima podignut nasad borovnica, vrlo lako može proizvoditi sadnice, kako za vlastitu potrebu tako i za prodaju. Od svih nabrojanih metoda, razmnožavanje reznicama najčešće se upotrebljava u praksi. Najveći problem ovog načina razmnožavanja je laka mogućnost prijenosa biljnih bolesti. Prilikom uzimanja reznica striktno se mora paziti na čistoću matičnih biljaka od virusa te njihova što izraženija sortna svojstva. Osim virusa, ovim se načinom razmnožavanja lako prenosi i rak. Ovim mjerama opreza osigurati ćemo visoku kvalitetu budućih sadnica i postići tržišni standard. Odabir matičnih biljaka za daljnje razmnožavanje najčešće se vrši tijekom cvatnje i berbe kada borovnica ispoljava svoja sortna svojstva, a virusi i ostale bolesti pokazuju simptome svoje prisutnosti (Krewer i Cline, 2003.)

Prema Istraživanju Araujo i Bruckner (2008.), razmnožavanje borovnica reznicama omogućava dobivanje velikog broja sadnica uz manji trošak u odnosu na druge metode što je ekonomski vrlo isplativije.

2.7.1. Razmnožavanje borovnice zelenim izdancima

Ovim načinom najčešće se razmnožava borovnica zečje oko (*V. ashei*) jer rezultira visokom ukorjenjenost koja iznosi 70-80%. Osim toga, proizvodnja sadnica ovim postupkom traje 6-8 tjedana što je velika prednost u odnosu na razmnožavanje zrelim reznicama koje traje i do 6 mjeseci. Za ovaj način razmnožavanja potrebno je osigurati opremu za stvaranje maglice (fogeri). Ovaj sustav je neophodan zbog toga jer se zelenim reznicama mora stvoriti i održavati sloj vode na listovima kako bi se spriječilo njihovo uvenuće i odumiranje. Obavezno je i postaviti mrežu ili plastičnu nadkrilku koja će čuvati reznice od vjetrova i sunca. One su posebno korisne ukoliko sustav navodnjavanja maglicom zakaže, nadkrilka očuva reznice od sušenja. Od supstrata se koristi mnogo toga, ali najčešće korištena je kompostirana borova kora zbog svoje lake dostupnosti i niske cijene. Reznice se mogu ukorjenjivati na dva načina, i to na uzdignutim gredicama ili u kontejnerima. Uzgoj u kontejnerima je preporučljiviji zbog bolje zaštite od gljivičnih bolesti koje žive u tlu. Reznice se kad dođe vrijeme za njihovo prikupljanje skidaju s

vrhova mladica i prosječno su duge 12 do 15 cm. Reznice se s matičnih biljaka uzimaju kad prestane intenzivni rast mladica a terminalni listovi dosegnu punu zrelost. Ovisno o sorti reznice za ukorjenjivanje se prikupljaju u razdoblju od kraja 4. i sredine 5. mjeseca. U nekim se područjima taj posao obavlja kasnije, i to krajem kolovoza i početkom rujna. Ovaj kasni period za tu aktivnost je nepovoljniji zbog opasnosti od ranih jesenskih mrazeva, zbog čega sustav za orošavanje reznica moramo oprezno rabiti, i isključiti ih na vrijeme jer bi mraz u to doba mogao biti poguban za cjelokupnu proizvodnju. Za borovnicu je specifično kako nema potrebu za hormonima tijekom ukorijenjivanja, jer se većina sorti lako ukorjenjuje, iako njihova primjena nije na odmet. Prilikom ukorijenjivanja treba najviše paziti na vlažnost supstrata jer nam prevelika vlaga stvara velike štete koje minimalno mogu usporiti rast, a najgore što se može dogoditi je odumiranje reznica i truljenje korijenovog sustava. Kad se reznice dobro ožile, postupno smanjujemo navodnjavanje omaglicom, iznosimo ih vani na sunčanije mjesto te ih navodnjavamo rasprskivačima, redovito prihranjujemo i vršimo zaštitu od štetočinja. Kad su se u potpunosti razvile, reznice tj. razvijene sadnice pripremamo za zimu sadeći ih u veće kontejnere ili u gredice s većim razmakom (Krewer i Cline, 2003.).

2.7.2. Razmnožavanje borovnice zrelim reznicama

Prema Camposu i sur. (2005.) najbolji period uzimanja zrelih reznica s matičnih biljki je tijekom zimske rezidbe.

U odnosu na prethodno opisan način, razmnožavanje zrelim reznicama daje neumjesnije nove sadnice. Razmnožavanjem ovim načinom se teže stvaraju bezvirusne sadnice, a osim toga kao drugi problem se postavlja i nedovoljan broj reznica u sorti s niskim habitusom i tanjim grančicama. Najveća prednost ovog načina razmnožavanja je manja briga i njega u procesu stvaranja novih sadnica tj. manja intenzivnost rada. Od sveukupnih reznica na kraju procesa dobijemo 70-80 % ukorjenjenih i gotovih sadnica. Reznice se uzimaju u siječnju ili veljači s donjih dijelova grančica. Istraživanjima se utvrdila korelacija između debljine reznica i zakorjenjivanja, tj. da se deblje reznice teže zakorjenjuju. Reznice se obično stavljaju na ukorjenjivanje (najčešće u gredice) u travnju te na istom mjestu ostaju cijelu tekuću vegetaciju do početka zime. Supstrat koji se koristi za gredice najčešće je kompostirana piljevina od crnogorice, a navodnjavanje se vrši rasprskivačima. Naravno, ukorjenjivanje se može vršiti i u zaštićenim prostorima plastenika ili staklenika što je

preporučljivije, te se pokazalo da poboljšava zakorjenjivanje biljaka. Faza buđenja pupova i razvijanje listova slijedi prije razvoja korijenja. U toj fazi reznicama prijeti isušivanje. Zbog sprječavanja te pojave i neprimanja reznica, tj. sušenja, koriste se mikrorasprskivači koji održavaju vlagu razvijenim listovima, sve dok reznice ne razviju korijen. Osim mikrorasprskivača, često se koriste i impaktni kojima navodnjavamo dnevno 3-4 sata, odnosno prilagođavamo razvojnem stadiju biljke. Na kraju procesa ukorjenjivanja, tj. u jesen, svaka sadnica bi trebala imati korijen dug 15 cm (Krewer i Cline, 2003.).

2.7.3. Razmnožavanje borovnica korjenovim izdancima

Kao i kod svake druge drvenaste biljke, tako su i kod borovnice korjenovi izdanci koje niču iz tla malo odmaknuti od grma. Jačina stvaranja ovih vrsta mladica je sortna karakteristika, a po tome se npr. izdvaja sorta Tifblue koja stvara znatan broj korjenovih izdanaka, a pogotovo onda kad je biljka u nekom slučaju oštećena. Kako bi dobili sadnicu od ovih vrsta mladica, one se moraju razvijati u nasadu dvije godine, a nakon toga se tijekom zime odvajaju od matične biljke. Nakon odvajanja od matične biljke, takve sadnice imaju nesrazmjer između nadzemnih i podzemnih dijelova biljke, tj. korijen je znatno manji od mladice. Zbog toga se tako izvađene sadnice obavezno oštro režu, a ukoliko se to ne učini biljka ne može normalno funkcionirati te ugiba. Nakon tog koraka slijedi premještanje, tj. sadnja takve sadnice na stalno mjesto u nasadu ili sadnja na podignute gredice još jednu vegetacijsku godinu gdje će se bolje razviti, što je svakako preporučljivije (Krewer i Cline, 2003.).

2.7.4. Razmnožavanje borovnice mikropropagacijom

Kao što je navedeno, borovnica se na više načina razmnožava vegetativno. Iako se ti načini razmnožavanja mnogo koriste njih prate razni problemi i nedostaci, kao npr. vrlo lak prijenos virusa i biljnih bolesti što je spomenuo u prethodnom poglavlju. Osim toga, kao problem se može javljati i sporost proizvodnje (zrele reznice) ili teškoće u provedbi. U zadnje vrijeme svjedočimo znatnoj ekspanziji proizvodnje sadnog materijala mikropropagacijom, kao i znanjem iz tog područja. Razlog tome je znatno brža proizvodnja i uspješnost stvaranja sadnog materijala (Jelaska, 1994.).

Mikropropagacija je tehnika brzog vegetativnog razmnožavanja biljaka u aseptičnim uvjetima na umjetnoj hranjivoj podlozi pod kontroliranim uvjetima rasta u staklu (*in vitro*). Godišnje se ovom tehnikom može dobiti 10^4 do 10^8 sadnica od jedne matične biljke. Isplativnost same proizvodnje sadnog materijala mikropropagacijom pokazuje i porast novih laboratorija za tu vrstu proizvodnje, kao i njihov kapacitet. U Nizozemskoj se podižu laboratoriji s kapacitetom od 5 milijuna sadnica. U toj zemlji većina proizvodnje odnosi se na sadnice cvijeća, dok je vodeća zemlja po proizvodnji voćnih sadnica mikropropagacijom Škotska (Pavlina, 1994.).

Prema istraživanju (Pierik, 1991.) u zapadnoj Europi je glavni proizvođač *in vitro* sadnica Nizozemska na koju otpada 27% sveukupne proizvodnje. Od sadnog materijala mikropropagacijom najviše se dobivaju lončanice koje zauzimaju 92% proizvodnje, a na sitno voće kojem pripada i borovnica otpada 9.35%

Pored spomenutih prednosti, proizvodnja sadnog materijala mikropropagacijom ima i niz slabosti. Prilikom prelaska biljaka iz *in vitro* u *in vivo* uvjete stvaraju se brojni problemi, poput velikog stvaranje bočnih izdanaka i grmolik izgled sadnica te vraćanje juvenilnog stadija dobivenih biljaka. U *in vivo* uvjetima razvijeno korijenje prestaje biti funkcionalno te se gubi vrijeme na stvaranje novog korijenja koji se prilagođuje novom supstratu i uvjetima. Na otvorenom biljke postaju osjetljivije na biljne bolesti i štetnike što iziskuje znatno povećanje zaštitnih mjera i poskupljuje proizvodnju (Jelaska, 1994.).

Prema istraživanju Smith (1986.) jedan od nedostataka mikropropagacije je i visoka cijena sadnica zbog vrlo opsežnog rada pri kloniranju biljaka.

Za uspostavljanje kulture tkiva koriste se kako vršni tako i bočni pupovi. Glavni parametar biranja pupova za mikropropagaciju je njihova starost i razvoj (Brissette i sur, 1990.). Prema istraživanjima Lyrene (1980. i 1981.) pupovi uzeti s juvenilnih biljaka su razvijali izboje brzo i lako dok su se izboji iz pupova uzetih s starih biljaka razvijali sporo s učestalom pojavom ponovne juvenilizacije. Do 1980. u svijetu se ovom tehnikom proizvodilo milijun sadnica borovnice (Mohamed i sur. 2018.). Pokazalo se da sadnice dobivene mikropropagacijom stvaraju širi grm, tj. imaju veću plodonosnu površinu što povećava prinos u usporedbi s klasičnim vegetativnim razmnožavanjem (Shiek i sur., 1996.). Istraživanje Debnath (2007.) dovodi u pitanje i ranije plodonošenje *in vitro* sadnica borovnice što bi svakako bilo povoljno u vidu ranijeg vraćanja investicije i početka prihoda

od kulture na radost proizvođača. Razmnožavanje borovnica mikropropagacijom je znatno zahtjevnije, ali pritom i mnogo efikasnije za budući prinos (Morrison i sur., 2000.).

Prema Debnathu (2007.) mikropropagaciju borovnice možemo obaviti tehnikom, odnosno metodom aksilarnog pupanja ili regeneracijom adventivnih izdanaka. Na kraju obje metode slijede faze ukorijenjivanja i aklimatizacije, tj. prijenosa biljaka iz *in vitro* uvjeta u *ex vitro* uvjete, tj. vanjske uvjete i prilagodba biljaka na njih.

Metoda aksilarnih pupova - samom metodom aksilarnih pupova razmnožavaju se tri vrste borovnica i to: niskogrmolika borovnica (Frett i Smagula, 1983.; Brissette i sur., 1990.; Debnath, 2004.), visokogrmolika (Cohen, 1980.; Zimmerman i Broome, 1980.; Wolfe i sur., 1983.; Grout i Reed, 1986.; Eccher i Noè, 1989.; Noè i Eccher, 1994.; Gonzalez i sur., 2000.) i borovnica zečje oko (Lyrene, 1980.). Danas se općenito za mikropropagaciju borovnice kao početni materijal uzima dio stabljike koji sadrže vršni i bočni pup koji služe kao eksplantantsko tkivo. Kao najveći problem mikropropagacije ove vrste je nepoželjno stvaranje velike količine kalusa pri samoj bazi eksplantanta, kao i stvaranje velikog broja adventivnih izbojaka (Zimmerman i Broome, 1980.; Litwińczuk i Szczerba, 1998.). Rast izbojaka možemo inicirati i iz postranog ili vršnog pupa. Sam proces razmnožavanja počinje u nasadu gdje tijekom zime prikupljamo zrele reznice koje steriliziramo i skladištimo na mjestu s niskom temperaturom. Po potrebi reznice uzimamo iz skladišta te kako bi potaknuli kretanje pupova stavljamo ih u vodu čija je toplina 26°C (2°C odstupanja se mogu tolerirati) danju, a noću 20°C s dužinom dana od 16 sati i intenzitetom svjetla od 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom 15 dana (Gonzalez i sur. 2000.). Kad se razviju izbojci iz bočnih pupova oni dalje služe kao izvor eksplantanata. Osim zrelih reznica, u istraživanjima su se kao početni materijal koristile i zelene reznice (Gonzalez i sur., 2000.), eksplantanti dobiveni iz sjemena (Lyrene 1980.), dijelovi korijena (Barker i Collins, 1963.) kao i mladice iz novog perioda rasta (Morrison i sur, 2000.; Debnath 2004.). Sastav hranidbene podloge i vrsta te koncentracija hormona u njoj prilagođavaju se specifičnostima korištenih kultivara. Klasični medij WPM kojeg su formulirali Lloyd i McCown (1980.) se pokazao odličan za mikropropagaciju sorte Bluecrop (Wolfe i sur. 1983.), dok se za niskogrmolike borovnice najbolji pokazao medij BM-C koji se koristi pri mikropropagaciji brusnice, a formulirali su ga Debnah i McRae (2001.), kao i Debnah (2004.). Uspješnom koncentrijom hormona za metodu aksilarnog pupanja pokazala se kombinacija 22.8 μM IAA i 73.8 μM 2iP (Zimmerman i Broome, 1980.). Frett i Smagula (1983.) su dokazali korelaciju između povećanja doze 2iP i stvaranja izbojaka kod niskogrmolike borovnice,

dok su tu istu pojavu Chandler i Draper (1986.) utvrdili kod tri sorte visokogrmolikih borovnica. Prema istraživanju Orlikowska (1986.) dokazano je povećanje broja izbojaka tretiranjem hormonom 2iP pri mraku i temperaturi od 4°C. Kao što vidimo iz iznesenoga, korist hormona 2iP je velika, kao i njegova primjena iako on nije bez nedostataka. Jedan od njih je i njegova fitotoksičnost uslijed većih doza što uzrokuje posmeđenje eksplantanata te njihovo odumiranje. Ta negativnost se smanjuje kombinacijom tog hormona s zeatinom, a uz to se ova kombinacija pokazala povoljnom zbog utjecaja na povećanu inicijaciju izbojaka (Eccher i Noe, 1989.). Za vrste *Vaccinium* zeatin se pokazao idealan za inicijaciju izbojaka (Reed i Abdelnour-Esquivel, 1991.; Gonzalez i sur., 2000.; Debnath, 2004.), kao i pozitivan utjecaj na dužinu izbojaka kako kod niskogrmolike borovnice (Debnath, 2004.) tako i kod visokogrmolike (Chandler i Draper, 1986.; Eccher i Noè, 1989.). S druge strane, Gonzalez i sur. (2000.) su dokazali da se mladice visokogrmolike borovnice najbolje multipliciraju primjenom hormona 2iP, i to u koncentraciji od 25 µm u hranjivoj podlozi. Hranjiva podloga koja služi za indukciju izbojaka mora sadržavati auksin kao što je IAA s koncentracijom npr. 5.7 µm (Morrison i sur, 2000.). Nasuprot tome, Frett i Smagula (1983.) tvrde da medij prije ukorjenjivanja treba sadržavati samo hormon 2iP. Utjecaj već spomenutog medija za brusnice s niskom dozom zeatina (2-4 µm) i saharoze (20 g L⁻¹) se vidi u istraživanju Debnath (2004.) gdje je utvrđeno povećanje izbojaka za 50-100% u vremenskom periodu od 12 tjedana. Prema istraživanju Debnath (2004.) dokazano je da svjetlo ima ključnu ulogu u morfološkom razvoju *in vitro* borovnice, tj. da se pri nižoj svjetlosnoj radijaciji dužina izbojaka povećava kod niskožnubastih borovnica. To dokazuju Noe i Eccher (1994.) koji su utvrdili negativnu korelaciju između jačine svjetla i izduživanja izbojaka kod visokogrmolikih borovnica.

Regeneracija adventivnih izdanaka - u kulturi tkiva prvo formiranje kalusa ostvarili su Nickerson i Hall (1976.) kod niskogrmolike borovnice na MS mediju koji je sadržavao 0.45-2.26 µm 2,4-D. Kako bi potakao rast kalusa Nitsch (1965.) je u hranjivu podlogu dodavao 0.45 µm 2,4-D i 0.46 µm kinetina. Primjena tih formulacija nije rezultirala povoljnim rezultatom u indukciji izbojaka iz kalusa. Zbog toga je Nickerson (1978.) za tu svrhu koristio Andersonov (1975.) medij koji sadrži IAA i 2iP koji je pokazao pozitivno djelovanje na proizvodnju izbojaka iz kalusa. Kod borovnice zečjeg oka formiranje kalusa prvi put ostvaruje Lyrene (1978.), dok regeneraciju izbojaka iz internodijskih segmenata prvi put ostvaruju Hruskoci i Read (1993.). Neka su istraživanja dokazala i razvoj metode gdje su se koristili listovi borovnice za inicijaciju (Billings i sur., 1988.; Dweikat i Lyrene,

1988.; Callow i sur., 1989.; Rowland i Ogden, 1992.; Cao i Hammerschlag, 2000.; Cao i sur., 2002.) Pri tome veliku ulogu igra mjesto lista na izbojku što je povezano s regeneracijom izbojka, kao i da mladi listovi imaju veći morfološki potencijal u odnosu na starije listove. Cao i sur. (2002.) su osmislili jednostavnu i povoljnu tehniku visokofrekventne regeneracije izbojaka s eksplantanta lista sorte Bluecrop koja se zasniva na dvostepenom predtretmanu i regeneraciji na hranjivoj podlozi s TDZ. To istraživanje je rezultiralo maksimalnom regeneracijom od 98% eksplantanata, tj. 11 izbojaka po svakom lisnom eksplantantu nakon 62 dana. Istraživanje je uključivalo kulture stare 2 tjedna koje su inokulirane s dva predtretmana s tim da je prvi tretman sadržavao 5 μ m TDZ i 2.6 μ m NAA te je trajao 4 dana, a drugi tretman je trajao 3 dana i sadržavao je 7 μ m zetina ribosida i 2.6 μ m NAA. Nakon toga je slijedila regeneracija koja je trajala 6 tjedana, a odvijala se na podlozi koja je sadržavala 1 μ m TDZ, a zadnji korak ovog postupka je rast eksplantanata na hranjivoj podlozi bez regulatora rasta za 10 dana.

Ukorjenjivanje i aklimatizacija – da je proces proizvodnje sadnica borovnice mikropropagacijom gotov može se reći tek onda kada već proizvedene *in vitro* izdanke premještamo iz hranjive podloge u supstrat i induciramo ih da stvaraju adventivno korjenje bilo u *in vitro* uvjetima ili *ex vitro* što se sve češće i prakticira. Ukorijenjivanje se odvija u kiselom supstratu kao što je mješavina perlita i treseta (Gonzalez i sur., 2000.) ili mješavinama treseta, vermikulita i perlita u omjeru 4:2:1 bez upotrebe predtretmana auksinom za ukorjenjivanje (Morison i sur., 2000.). Prema istraživanju Gonzalez i sur. (2000.) za *ex vitro* ukorijenjivanje sadnica borovnice predtretman auksinom je nepotreban, dok je s druge strane Debnath (2004.) dokazao uspješno ukorijenjivanje 85-95% niskogrmolikih borovnica tretiranih s 4.9 mM IBA prije sadnje u supstrat koji se sastojao od treseta i perlita u omjeru od 2:1. Prilikom faze ukorijenjivanja *ex vitro* sadnica borovnice neophodno je osigurati vrlo visoku relativnu vlažnost zraka od 95% što se postiže ovlaživačima zraka, tzv. misterima u komori koja je za to primjerena. Nakon toga se sadnice premještaju na aklimatizaciju u zaštićeni prostor (plastenik ili staklenik) gdje je relativna vlaga zraka 85%. Zimmerman (1987.) iznosi da ukorijenjivanje izdanaka u *ex vitro* uvjetima smanjuje trokove proizvodnje. Negativnost takvog načina ukorijenjivanja je u znatno većoj sporosti u odnosu na *in vitro* ukorijenjivanje (Wolfe i sur., 1983.). Tijekom ukorijenjivanja izbojaka u *in vitro* uvjetima možemo utjecati i na njihovo produljenje i to dodavanjem zeatina u količini od 1-2 μ m supstratu (Debnath, 2007.).

2.7.5. Mikropropagacija borovnice u bioreaktorima

Zbog visoke cijene proizvodnje mikropropagacija borovnice na čvrstom mediju nije idealna za veliku industrijsku proizvodnju. Zbog toga su u proizvodnju uvedeni bioreaktori koji su zbog tekuće kulture i automatizacije u mogućnosti riješiti određene probleme koje prate konvencionalnu *in vitro* mikropropagaciju, poput ručnog obavljanja nekih faza mikropropagacije (Paek i sur., 2005.). Automatizirani bioreaktori su važni za količinsko veliku industrijsku proizvodnju mikrorazmnoženog bilja (Levin i Vasil, 1989.). Osim toga, uporaba bioreaktora omogućuje i dodatno kontroliranje fizičkih i kemijskih čimbenika kao što su sadržaj CO₂, jačina svijetla i izmjena zraka. Sve to znatno utječe na bolji razvoj biljaka tijekom odvijanja mikropropagacije (Arencibia i sur., 2008.; Bernal i sur., 2008.; Liu, 2010.). Optimiziranost bioreaktora mogla bi se učiniti korištenjem različitog spektra staklenog i plastičnog materijala u izradi te bi tako bili optimalni za korištenje u velikim industrijskim postrojenjima za mikropropagaciju (Etienne i Berthouly, 2002.). Dosada se sustav mikropropagacije bioreaktorima pokazao znatno jeftiniji u odnosu na konvencionalnu mikropropagaciju kako zbog opreme tako i zbog održavanja tijekom same mikropropagacije. Ovakav načini mikropropagacije borovnice je novina u proizvodnji s kontroliranim uvjetima poput obogaćivanja CO₂, jačeg osvjetljenja i smanjene doze saharoze u mediju. Zbog lakše kontrole uvjeta, primjena bioreaktora u proizvodnji omogućuje poboljšanje u fiziološkim procesima biljke, kao npr. fotosinteze u uvjetima *in vitro*. U odnosu na konvencionalni sustav mikropropagacije, sadnice proizvedene u bioreaktorima pokazuju jači stupanj rasta i adaptibilnosti na vanjske uvjete pri prebacivanju u *ex vitro* uvjete (Arencibia i Garcia Gonzales, 2013.). Povećanje koncentracije CO₂ i redukcija saharoze tijekom rasta i multiplikacije u mediju znatno utječe na povećanje rasta tijekom aklimatizacije u uvjetima *ex vitro* (Kozai i sur., 1995; Janick i Ziv, 2000.). Osmišljavanje tekuće kulture bio je presudan korak k automatizaciji u procesima kulture tkiva (Aitken-Christie i sur., 1995.). Kao prednosti tekućeg medija još se izdvajaju i veća uniformiranost izdanaka, lako obnavljanje medija, sterilizacija ultrafiltracijom, korištenje velikih kontejnera i time veća proizvodnja, vrijeme postavljanja eksplantata u kulturu je mnogo manje (Debnath, 2010.). Nedostaci tekućeg medija su izmjena plinova kod biljaka što uzrokuje asfiksiju i preveliku hidriranost eksplantata, a to uzrokuje deformaciju biljnog materijala i sam gubitak eksplantata (Detrez i sur., 1994.). Deformaciju uzrokuju prevelika hidracija listova uslijed čega se poremeti lisna anatomija. Osim toga, simptomi vitifikacije su poremećaj enzimatskih aktivnosti i sinteze proteina,

prehidriranost stanica, smanjenje klorofila i kutikularnog voska te slaba lignifikacija (Ziv, 1991. a, b). Kako bi mikropropagacija na tekućem mediju napredovala treba istraživačkim radom naći rješenje za hiperhidriranost i izmjenu plinova unutar bioreaktora. Do sada na vidiku su kao rješenje za te probleme uporaba biljnih retardanata koji bi smanjivali veliko izduživanje izdanaka i korištenje TIB bioreaktora (TIB; Ziv i sur., 2003.). Korištenje MS podloge bez agara tj. u tekućem obliku pokazala se povoljnom za povećanje broja formiranih izdanaka (Ramage i Williams, 2003.). Razlog tomu je utjecaj tvari koje sadrži agar, a oni koče razvoj eksplanata u *in vitro* uvjetima time što sprječavaju usvajanje mineranih komponenata iz medija (Leifert i sur., 1995.). To potvrđuje i Adelberg (2006.) koji je utvrdio brži rast biljaka i veću biljnu masu kod uzgoja na tekućem mediju u odnosu na konvencionalni medij koji sadrži agar. Sama definicija bioreaktora glasi da je to samostalni i sterilni sistem koji radi na principu tekućeg medija ili na principu tekućeg zračnog sistema, tj. dotoka i izljeva tekućeg medija i od eksplanata koji je dizajniran za intenzivnu proizvodnju i strogu kontrolu proizvodnih mikro uvjeta (Paek i sur., 2005.). Karakteristike bioreaktora su i velika zapremina tekućih kultura te lako kontroliranje pH, temperature, koncentracije kisika i ugljičnog dioksida. Mikro uvjeti u bioreaktoru moraju biti strogo kontrolirani.

2.8. Dosadašnja istraživanja mikropropagacije borovnice *in vitro*

Još prije početka korištenja mikropropagacije Barker i Collins (1963.) su razmnožavali borovnicu pomoću njenih rizoma na Whiteovoj (1943.) hranjivoj podlozi koja nije sadržavala regulatore rasta, pa se može reći da su oni bili preteče razmnožavanja kulturom tkiva. Pravi početak razmnožavanja *Vaccinium* vrsta kulturom tkiva počinje 1978.-79. godine, a istraživači koji su je uveli bili su Lyrene (1978.) te Cohen i Elliot (1979.). Razmnožavanje borovnice *in vitro* metodama istražuje se zadnjih 30 godina. Tijekom tog vremena istraživači su zaključili da su glavni problemi u mikropropagaciji borovnice utjecaj raznih vrsta hormona i hranjivih podloga na efikasnost stvaranja izdanaka (Lyrene, 1980.; Eccher i Noe, 1989.; Reed i Abdelnour-Esquivel, 1991.; Gonzalez i sur., 2000.; Ostrolucka i sur., 2002.; Tetsumura i sur., 2008.; Jiang i sur., 2009.). Istraživanjem Debnath i McRae (2001.) je utvrđeno da je za borovnicu najpovoljniji medij koji sadrži nisku koncentraciju iona. Lloyd i Mccow (1980.) su utvrdili da je za borovnicu najpovoljniji WPM medij dok su Sedlak i Paprstein (2009.) kao i Debnath (2004., 2007.)

na BM-C mediju uveli u *in vitro* kulturu niskogrmoliku borovnicu (Debnath i McRae, 2001.). Medij koji se sastojao od mješavine WMP medija s 20 μ M zeatina te Murashige i Skoog (1962.) MS medija u omjeru 1:1 se pokazao najboljim za utjecaj na izduživanje izdanaka kod visokogrmolikih borovnica (Tetsumura i sur., 2008.). Nasuprot tome, Gonzalez i sur. (2000.) su zaključili da se kod visokogrmolikih borovnica najbolje utječe na multiplikaciju i izduživanje izdanaka s medijem koji sadržava 25 μ M N6-[2-isopentenyl] adenin (2iP). Osim kod visokogrmolikih borovnica, Debnath (2004.) je utvrdio i kako je zeatin odličan za inicijaciju i izdužavanje izdanaka i kod niskogrmolike borovnice. Ružić i sur. (2012.) su utvrdili nadmoć AN medija u odnosu na MS medij zbog utjecaja na inicijaciju i porast izdanaka. Medij AN je nakon WPM medija najčešće korišten za mikropropagaciju visokogrmolike borovnice (Gajdošova i sur., 2006.; Ostrolucka i sur., 2002.; Ostrolucka i sur., 2007.). Također se i WMP medij pokazao inferiornim u odnosu na MS medij, kao i na mješavinu MS i WPM u utjecaju na multiplikaciju i sam rast izdanaka (Tetsumura i sur., 2008.). Zeatin se pokazao kao superioran u odnosu na ostale hormone iz skupine citokinina za poticanje inicijacije izbojaka kod 8 od 12 vrsta iz roda *Vaccinium* (Reed i Abdelnour- Esquivel, 1991.). Prema utjecaju na izduživanje izbojaka, primjena visokih doza zeatina (10-20 mg L⁻¹) se pokazalo najboljim kod visokogrmolikih borovnica (Eccker i Noe, 1989.), dok su se male doze istog hormona (0.5 mg L⁻¹) pokazao povoljnim za poticanje indukcije izbojaka (Gajdošova i sur., 2006.). Korištenje hormona IAA pomiješanog s 2iP nije dalo zadovoljavajuće rezultate na indukciju i elongaciju izbojaka (Gonzalez i sur., 2000.). Litwinzuck i Wadas (2008.) su dokazali utjecaj kombinacije hormona IBA i citokinina na poboljšanje mikropropagacije borovnice utjecajem na poticanje aksilarnih izdanaka, dok su s druge strane inhibirali stvaranje adventivnih izdanaka. Nasuprot tome, Litwinzuck i Wadas (2009.) su dokazali da IBA negativno utječe na mikropropagaciju borovnice utjecajem na smanjenje rasta izdanaka, kao i povezanost s ugibanjem eksplantata. To stajalište potvrđuje i istraživanje Ružić i sur. (2012.), ali su oni taj utjecaj dokazali samo pri visokim dozama IBA poput 5 mg L⁻¹.

Zbog nedostatne automatizacije, sporosti i same skupoće proizvodnje, konvencionalna proizvodnja na polukrutom mediju je bila nezadovoljavajuća za industrijsku proizvodnju koja je zahtjevala što veću količinu proizvedenih sadnica unutar što manjeg vremena i što veću automatizaciju procesa. Zbog toga su predstavljeni bioreaktori koji su te nedostatke konvencionalne proizvodnje otklonili, što svjedoče i brojna istraživanja (Lorenzo i

sur., 1998.; Escalona i sur., 2003.; Ibaraki i sur., 2001.; Paek i sur., 2005.; Piao i sur., 2003.; Chakrabarty i sur., 2003.). Debnath (2009.) je jedini koji nas do sada obavještava o korištenju bioreaktora u mikropropagaciji borovnice. Prilikom razmnožavanja borovnice u bioreaktoru koristi se tekući medij koji sadrži zeatin u količini od 1-2 μm . Ukoliko se eksplantanti uzgajaju na mediju koji ne sadrži citokinine on stvara samo 1-2 slaba izdanka. Kao objašnjenje za tu pojavu (George i Sherrington, 1984.) navode da je ta pojava najvjerojatnije uzrok prevelike apikalne dominacije. Eksplantanti uzgajani na tekućem mediju u bioreaktoru ostvaruju tri puta veću dužinu izbojaka u odnosu na konvencionalnu tehnologiju, kao i manju dozu zeatina za poticanje rasta (Debnath, 2009.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija za kulturu tkiva

Smisao i cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na ispitivanja mogućnosti mikropropagacije borovnice tehnikom *in vitro* na polukrutom mediju. U ovom istraživanju uspoređivan je utjecaj određenih koncentracija hormona zeatina na uspješnost multiplikacije i morfološke karakteristike 3 privredno značajna kultivara visoko grmolike borovnice.

Istraživanje se odvijalo u laboratoriju za voćarstvo koji se nalazi u sklopu Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo na Agrobiotehničkom fakultetu u Osijeku. U tom se laboratoriju čine razna *in vitro* istraživanja i eksperimenti na više voćnih vrsta, kao što su lijeska, orah, borovnica, višnja, malina, maslina, trešnja, itd.

Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo se bavi edukacijom studenata, proizvodnjom sadnog materijala i znanstveno-istraživačkim radom pri čemu se stavlja naglasak na razvijanje i poboljšanje protokola u cilju razvoja selekcijskog rada i oplemenjivanja voćnih vrsta. Kako bi se istraživanja odvijala uspješno i kvalitetno laboratorij je opremljen svom potrebnom opremom za mikropropagaciju, kao što je autoklav, laminar, klima-komora, magnetna mješalica s grijalicom, pH-metar, teglice, skalpeli, sterilizator, pincete itd. Za uzimanje eksplantata u prizemlju Fakulteta se nalazi matičnjak koji je prijavljen u centru za rasadničarstvo pri HAPIH, a sam taj prostor služi i za aklimatizaciju (slika 10.).



Slika 10. Prostor za aklimatizaciju i matičnjak voćnih vrsta FAZOS (Foto: Glavan, 2019.)

3.2. Biljni materijal – sortiment u pokusu

U ovom istraživanju kao biljni materijali korišteni su eksplantanti uzeti s matičnih biljaka unutar atrijske fakulteta. Korišten je biljni materijal uveden u kulturu tkiva prethodnih godina na kojem se vrše istraživanja druge tematike. Radi se o sljedećem sortimentu tri visokogrmolike borovnice: Blue crop, Legacy i Duke.

Bluecrop - sorta koja posljednjih godina drži prvo mjesto u preporučenom sortimentu za preradu. Vrlo je laka za uzgoj s minimalno problema u uzgoju. Vrlo lako podnosi proljetne mrazeve, a prinosi su joj veliki i konzistentni. Nedostatak ove sorte je dosta čest opor okus i crveni, tj. nedovoljno obojeni vrhovi ploda. Upitna je sorta za strojno branje. Plod joj je svijetlo plave boje, a veličina je srednja do velika. Zahtjeva veliku sumu inaktivnih temperatura.



Slika 11. Sorta Blue crop (Izvor: <https://www.prodajasadnica.com>)

Duke - stvara uspravan bujan grm s ovalnim tamnozelenim listovima koji su atraktivni kad pocrvene u jesen. Cvatnja joj je kasna što je velika prednost zbog izbjegavanja kasnih proljetnih mrazeva, dok je dozrijevanje rano. Okus ploda je sladak i kao takav privlačan za ptice koje čine štetu. Ova sorta je dobitnica prestižne nagrade Award of garden merit koju dodjeljuje kraljevsko hortikulturno društvo. Može narasti do visine od 210 cm. Vodeća je

rana sorta visokogrmolikih borovnica. Prinosi su visoki i veličinom uniformirani s visokom kvalitetom ploda. Zbog svoje visoke bujnosti, održavanje ove sorte može biti problematično. Idealna je za mehaniziranu berbu.



Slika 12. Sorta Duke (Izvor: <https://drijen.hr>)

Legacy - sorta borovnice stvorena na sveučilištu Rutgers od strane USDA i NJAES 1993 godine. Cvatnja joj počinje 1. travnja, dok sazrijeva i bere se od 30. svibnja do 3. lipnja. Habitus joj je uspravan i bujan s fleksibilnim grančicama koje su obrasle cvjetnim pupovima. Visoko produktivna sorta koja stvara visokokvalitetne plodove. Za svježju potrošnju se može brati i strojno. Zbog svoje rane cvatnje često strada od kasnih proljetnih mrazeva koji čine znatnu štetu. Osim toga, nedostatak joj je i osjetljivost na gljivu *Botryosphaeria corticis*. Zbog svog visokog prinosa i kvalitete ploda ima potencijal da postane vodeća sorta borovnice.



Slika 13. Sorta Legacy (Izvor: <http://www.sadnicaudom.hr>)

3.3. Opis pokusa i tretmani u istraživanju

U ovom istraživanju korišten je polukruti hranjivi WPM medij u svim primijenjenim tretmanima. Svaki tretman uključivao je drugačiju koncentraciju citokina zeatina prema tablici 1.

Laboratorijski pribor (pincete, skalpeli, podloška za disekciju i multiplikaciju, teglice, posude s medijem, voda za hlađenje pribora, itd.) je steriliziran 20 minuta u autoklavu na 121°C pri tlaku od 1.2 bara. Sterilizacija radnog prostora tj. laminarne komore je izvršena 70% - im etanolom nakon čega se dodatno koristila i UV lampa u trajanju od 60 minuta. Nakon sterilizacije pribora, prostora i medija, teglice su se u laminaru punile steriliziranim medijem bez hormona i to svaka sa po 100 ml. Prilikom pripreme medija pH se podesio acidofilnoj borovnici na vrijednost pH 5.0. Pošto je poznato da citokinin zeatin nije stabilan pri visokoj temperaturi (termolabilan, poništava se efekt), zeatin se naknadno dodavao ohlađenom mediju na <50°C preko hidrofilnog PTFE syringe filtera 0.2 µm u tretmane s koncentracijom od 0.5, 1 i 2 ml/l. Jedino je ponovljeni tretman s koncentracijom od 2 ml/l zeatina autoklaviran zajedno s medijem u cilju utvrđivanja opadanja djelotvornosti koncentracije zeatina (tablica 1.).

Tablica 1. Prikaz tretmana u istraživanju

Tretman	Hranjivi medij	Citokinin / koncentracija	Kultivar
T1 – 0.5 ml	WPM	Zeatin 0.5 ml	Bluecrop, Duke, Legacy
T2 – 1 ml	WPM	Zeatin 1 ml	Bluecrop, Duke, Legacy
T3 – 2 ml	WPM	Zeatin 2 ml	Bluecrop, Duke, Legacy
T4 – 2 ml*	WPM	Zeatin 2 ml* (*autoklaviran)	Bluecrop, Duke, Legacy

Po završetku hlađenja i stvrdnjavanja medija pristupilo se uvođenju eksplantata u laminarnu komoru. Eksplantati su disecirani s izdanka biljaka već uvedenih u kulturu prethodnih mjeseci. Disecirani su nodijalni segmenti s jednim do dva nodija te vrlo pažljivo preneseni na hranjivi medij (slika 14.).



Slika 14. Disekcija nodijalnih segmenata borovnice (Foto: Glavan, 2019.)

Svaki tretman sadržavao je po četiri teglice, odnosno ponavljanja za svaku sortu (slika 15.). Svaka teglica sadržavala je po 50 eksplantata. Na temelju iznesenog dobivamo sljedeće: 4 teglice x 4 tretmana = 16 teglica x 50 eksplantanata = 800 eksplantanata x 3 kultivara = 2.400 eksplantata (mjerjenja). Nakon završetka postavljanja eksplantata na polukruti medij, teglice su premještene u klima komoru s kontroliranim uvjetima: temperatura od 24°C i fotoperiodom svjetlosti od 16/8 (16 sati svjetlo, 8 sati mrak). Intenzitet svjetlosti u svjetloj fazi iznosio je 3.850 lux-a.



Slika 15. Nodijalni segmenti u mediju (Foto: Glavan, 2019.)

3.3.1. Wood Plant Medij (WPM)

Ovaj medij su osmislili i složili Lloyd i McCown 1981. godine tijekom mikropropagacije vrste *Kalmia latifolia*. Od tada do danas ovaj medij je ekspandirao u jednog od najčešće korištenih medija za mnoge vrste. Sastoji se od mješavine vitamina, aminokiselina i anorganskih tvari. U ovom istraživanju u medij su se još dodali saharoza koja je služila kao izvor ugljika i agar za učvršćenje medija. Detaljan sastav medija korištenog u ovom istraživanju prikazan je u tablici br. 2.

Tablica 2. Sastav medija WPM (Lloyd i McCown, 1980.)

<u>Mikro elementi</u>	mg/l	<u>Makro elementi</u>	mg/l	<u>Organski i ostali dodaci</u>	mg/l
<i>CuSO₄ x 5H₂O</i>	0.25	<i>CaCl₂</i>	72.50	<i>Saharoza</i>	30000.00
<i>FeNaEDTA</i>	36.70	<i>Ca(NO₃)₂x4H₂O</i>	471.26	<i>Agar</i>	6500.00
<i>H₃BO₃</i>	6.20	<i>KH₂PO₄</i>	170.00	<i>Glicin</i>	2.00
<i>MnSO₄ x H₂O</i>	22.30	<i>K₂SO₄</i>	990.00	<i>Myo-inositol</i>	100.00
<i>Na₂MnO₄x2H₂O</i>	0.25	<i>MgSO₄</i>	180.54	<i>Nikotinska kiselina</i>	0.50
<i>ZnSO₄ x 7H₂O</i>	8.60	<i>NH₄NO₃</i>	400.00	<i>Piridoksin HCl</i>	0.50
				<i>Tiamin HCl</i>	1.00

3.3.2. Zeatin

Zeatin kao tvar pripada u skupinu hormona poznatih pod nazivom citokinini. Dobiva se iz purinskog adenina. Otkriven je prvi put u nezrelom zrnu kukuruza. Dokazano je da se nalazi u većim količinama u kokosovu mlijeku koji se prijašnjih godina i koristio u mikropropagaciji u svrhu pospješivanja rasta eksplantata. Razlozi zbog kojih se ova tvar dosta često koristi u mikropropagaciji je dobar utjecaj na formiranje kalusa (pogotovo ako se kombinira s auksinom) i poticanje aksilarnih izbojaka na rast i cvatnju. Osim toga,

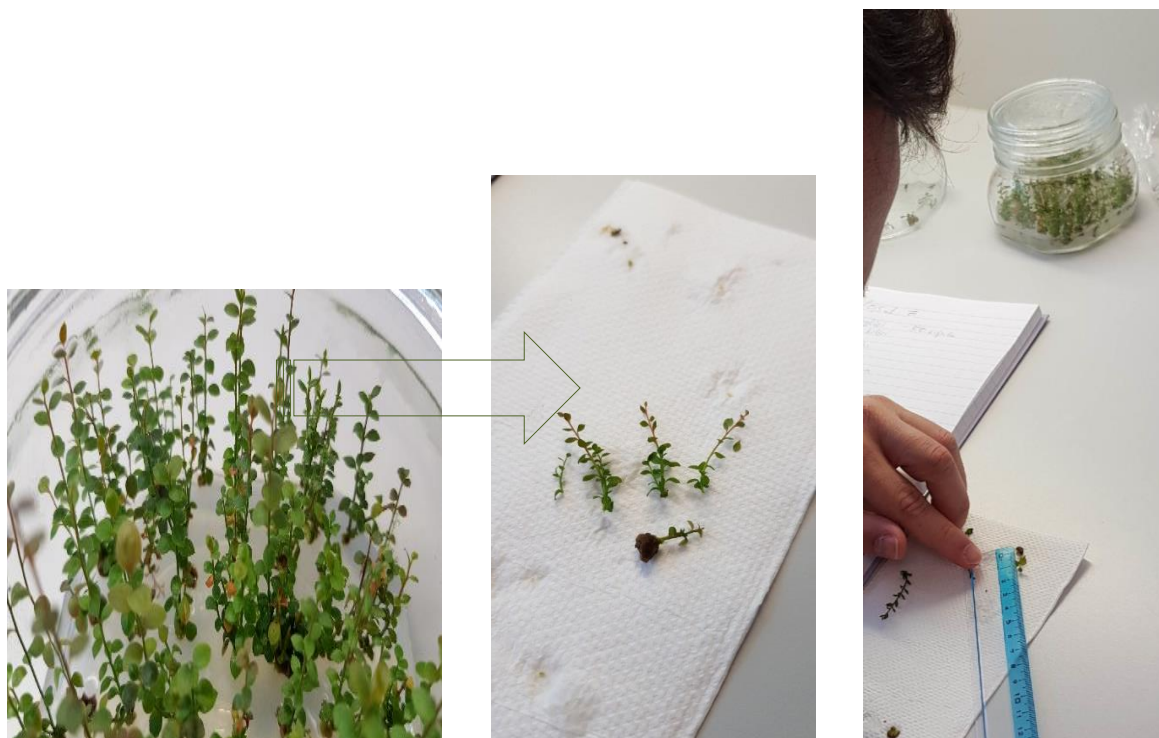
koristi se i za poticanje rasta sijanaca kao i za germinizaciju sjemenja. U ovome istraživanju glavni cilj je dokazivanje utjecaja ove tvari na mikropropagaciju borovnice.

3.4. Mjerenja u istraživanju

U ovom istraživanju promatrali smo utjecaj tretmana na sljedeće parametre:

- ✓ Broj izdanaka
- ✓ Visina izdanaka
- ✓ Broj listova
- ✓ Multiplikacija

Mjerenja su obavljena nakon što su eksplantanti dosegli odgovarajuću vegetativnu masu, odnosno nakon 30 dana od postavljanja pokusa (slika 16.).



Slika 16. Mjerenja promatranih parametara u istraživanju (Foto: Bošnjak, 2019.)

3.5. Obrada dobivenih podataka

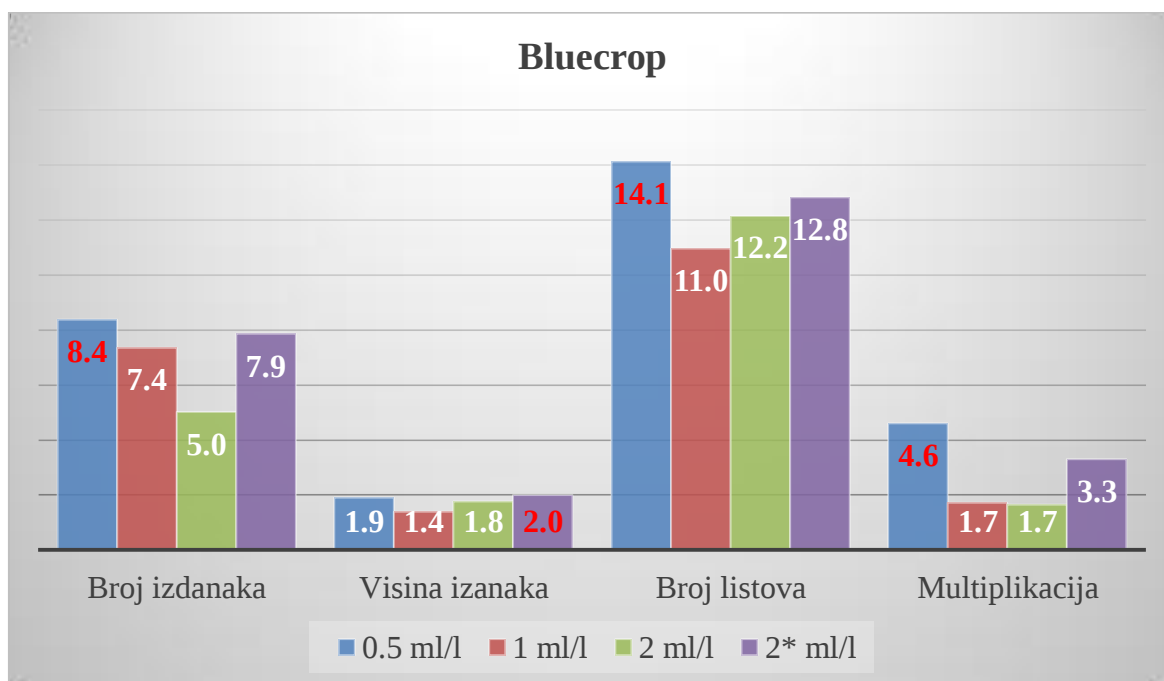
Nakon što su izmjereni svi promatrani parametri, isti su analizirani u programima za statističku obradu podataka Microsoft Office Excel 2013, SAS Software 9.3., programske podrške (2002.-2010., SAS Institute Inc., Cary, USA). Od statističkih metoda korištena je analiza varijance (ANOVA), kao i statistički testovi značajnosti za primijenjene tretmane, odnosno F-test i Fisher's LSD (*engl.* Least Significant Difference) u vrijednosti razine od $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI

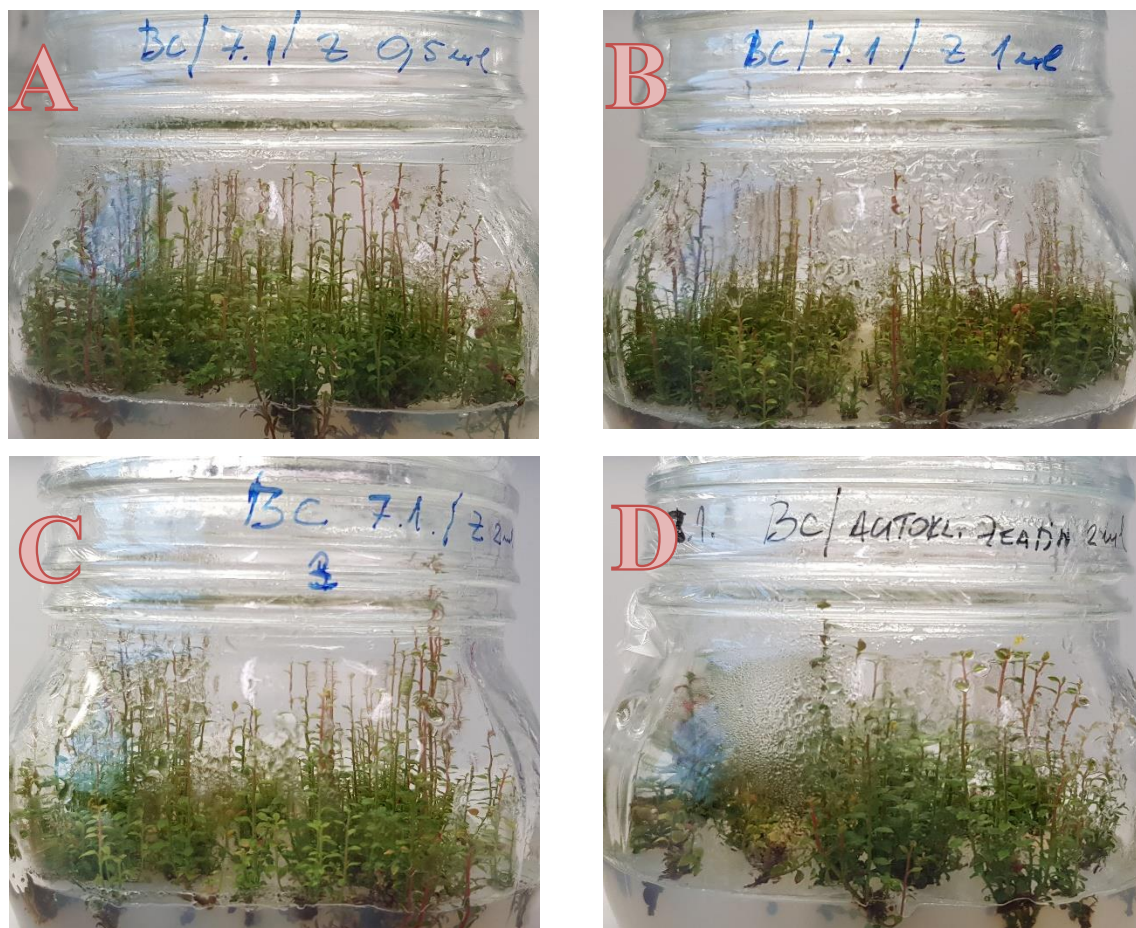
4.1. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Bluecrop

Kao što je vidljivo iz grafikona 3. najveći broj izdanaka dobiven je pri koncentraciji zeatina od 0.5 ml/l (8.4), zatim 2* ml/l (7.9) i 1 ml/l (7.4), najlošije je rezultirala koncentracija od 2 ml/l (5.0). Visina izdanaka najveća je pri koncentraciji od 2* ml/l (2.0), zatim 0.5 ml/l (1.9), 2 ml/l (1.8) i 1 ml/l (1.4) koji je rezultirao najkraćim izdancima. Broj listova pri koncentraciji od 0.5 ml/l (14.1) bio je najveći, zatim 2* ml/l (12.8), 2 ml/l (12.2) i najmanji broj listova pri koncentraciji 1 ml/l (11.0). Multiplikacija je najveća kod koncentracije 0.5 ml/l (4.6), zatim 2* ml/l (3.3), a podjednaka pri koncentracijama od 1 i 2 ml/l zeatina (1.7).

Iz navedenih rezultata za kultivar Bluecrop (Slika 17. i Grafikon 3.) vidljivo je kako su koncentracije zeatina od 0.5 ml/l i 2* ml/l (autoklavirani) rezultirali najboljim rezultatima u mjerenju po pitanju promatranih parametara. Mala prednost ide koncentraciji od 0.5 ml/l zeatina jer je rezultirala većim brojem izdanaka pa samim time i većom stopom multiplikacije.



Grafikon 3. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Bluecrop

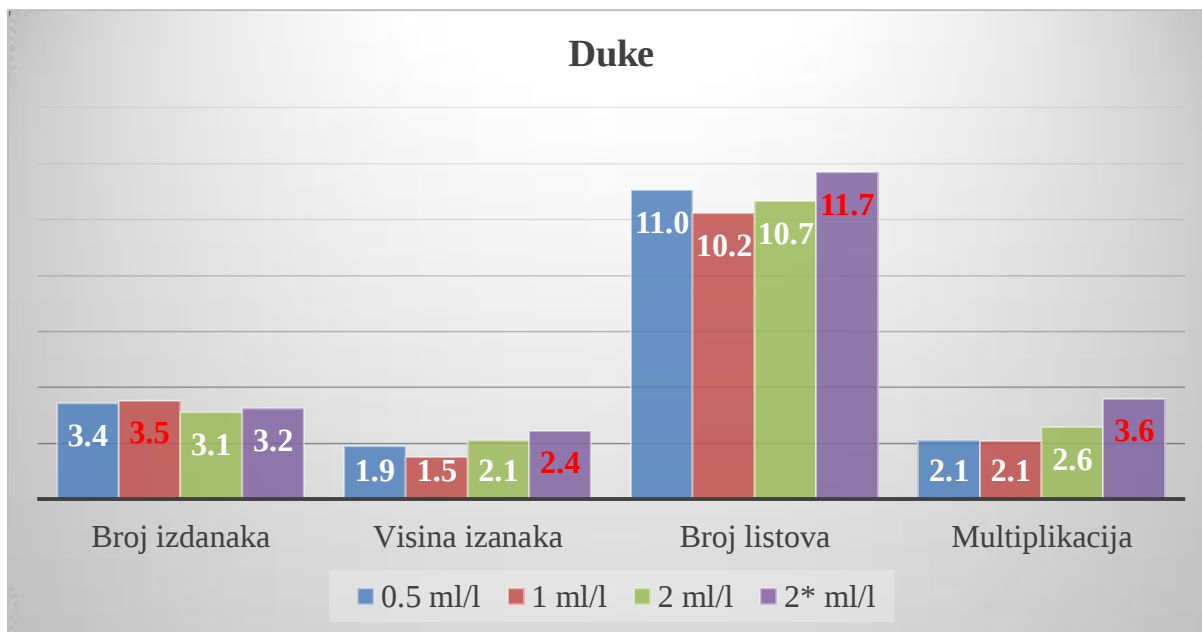


Slika 17. Kultivar Bluecrop pri tretanima A - 0.5 ml/l, B – 1 ml/l, C - 2 ml/l, D - 2* ml/l
(Foto: Bošnjak, 2019)

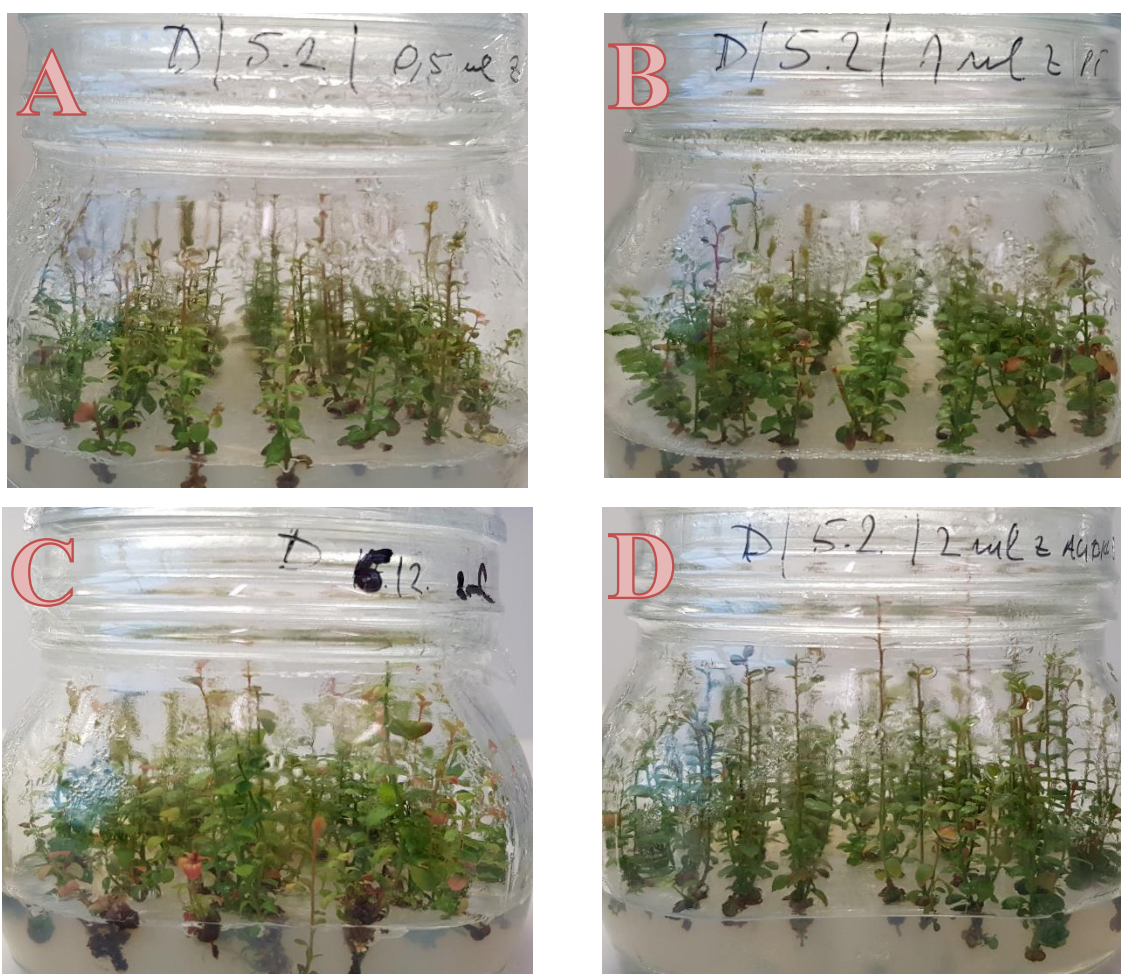
4.2. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Duke

Prema grafikonu 4., kultivar Duke (Slika 18.) rezultirao je najvećim brojem izdanaka pri tretmanu 1 ml/l (3.5), zatim 0.5 ml/l (3.4), 2* ml/l (3.2) i najmanjim brojem izdanaka pri tretmanu 2 ml/l (3.1). Najveća visina izdanaka zabilježena je pri tretmanu zeatinom s 2* ml/l (2.4), zatim 2 ml/l (2.1), 0.5 ml/l (1.9) i najmanja pri tretmanu 1 ml/l (1.5). Broj listova je bio najveći kod tretmana 2* ml/l (11.7), zatim 0.5 ml/l (11.0), 2 ml/l (10.7) i najmanji pri 1 ml/l (10.2). Najveća stopa multiplikacije zabilježena je također pri tretmanu od 2* ml/l (3.6), zatim 2 ml/l (2.6), a oba tretmana od 0.5 i 1 ml/l rezultirali su podjednako s najnižom multiplikacijom (2.1).

Prema iznesenim rezultatima za kultivar Duke (Grafikon 4.) koncentracija od 2* ml/l (autoklavirana koncentracija zeatina od 2 ml/l) također je rezultirala najučinkovitije po pitanju promatranih parametara.



Grafikon 4. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Duke

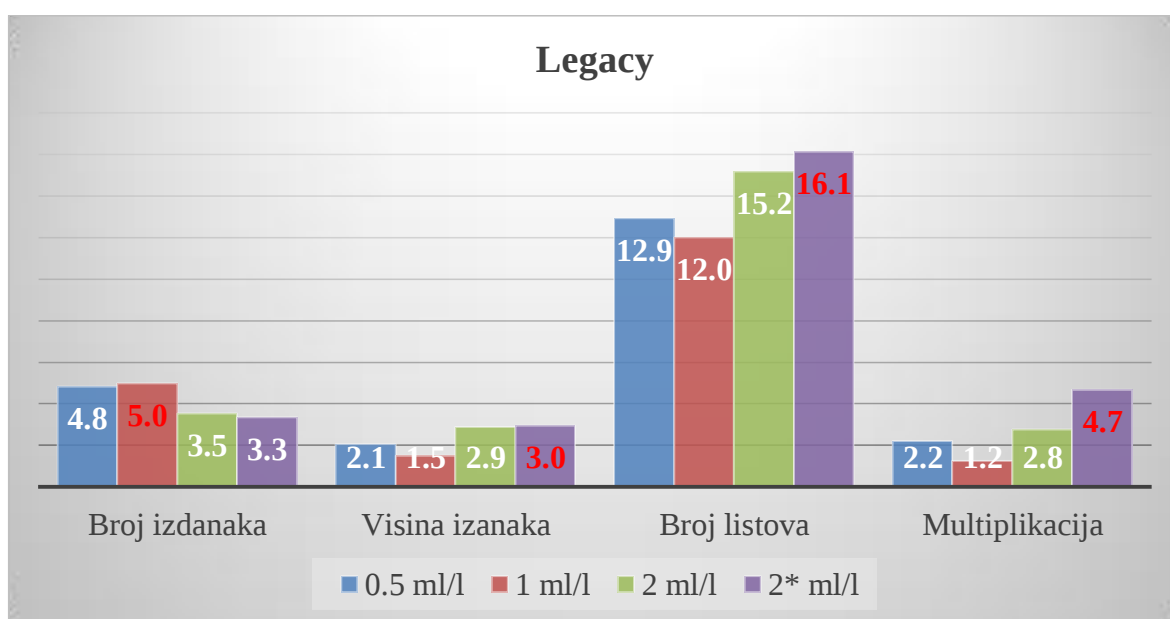


Slika 18. Kultivar Duke pri tretanima A - 0.5 ml/l, B – 1 ml/l, C - 2 ml/l, D - 2* ml/l

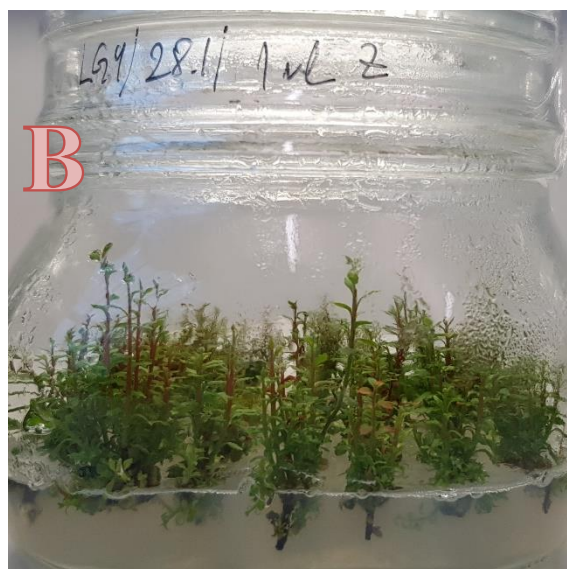
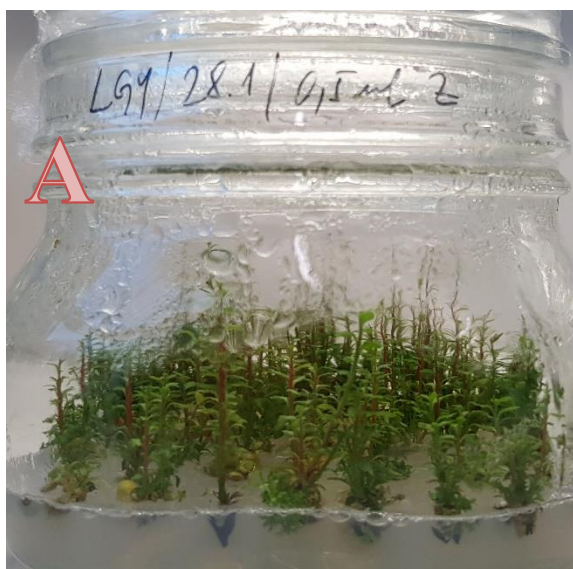
(Foto: Bošnjak, 2019)

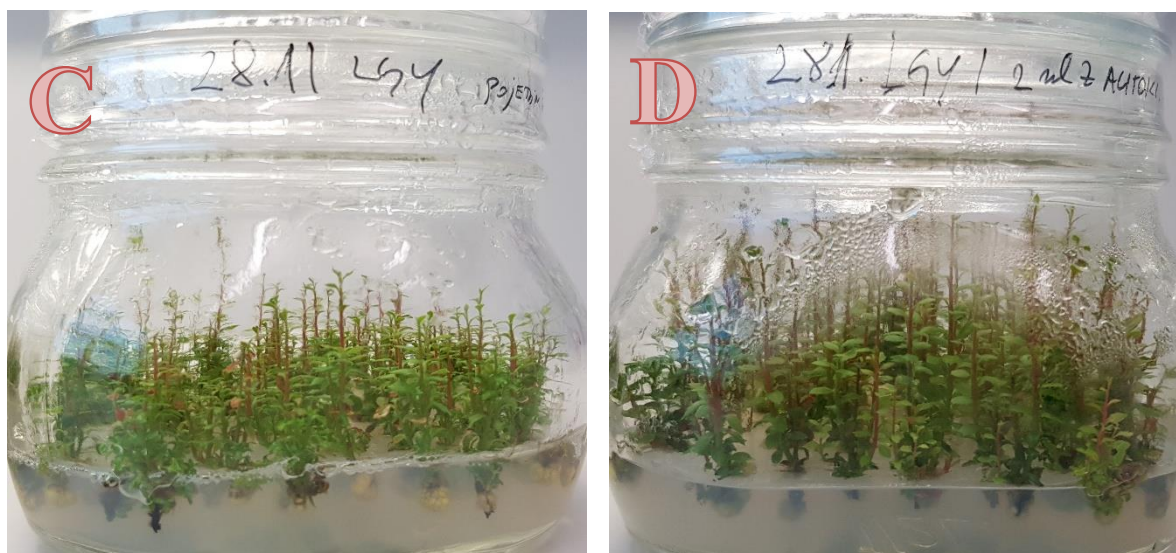
4.3. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Legacy

Broj izdanaka kod kultivara Legacy (Slika 19. i Grafikon 5.) pri koncentraciji zeatina od 1 ml/l (5.0) bio je najveći, zatim pri 0.5 ml/l (4.8), 2 ml/l (3.5) i najmanji pri 2* ml/l (3.3). Visina izdanaka bila je najveća pri 2* ml/l (3.0), zatim 2 ml/l (2.9), 0.5 ml/l (2.1) i najmanja kod 1 ml/l (1.5). Najveći broj listova rezultirao je tretman s 2* ml/l (16.1), zatim 2 ml/l (15.2), 0.5 ml/l (12.9) i s najmanje 1 ml/l (12.0) zeatina. Najveća stopa multiplikacije dobivena je na tretmanu s 2* ml/l zeatina (4.7), zatim 2 ml/l (2.8), 0.5 ml/l (2.2) i najmanja pri 1 ml/l zeatina (1.2)



Grafikon 5. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Legacy





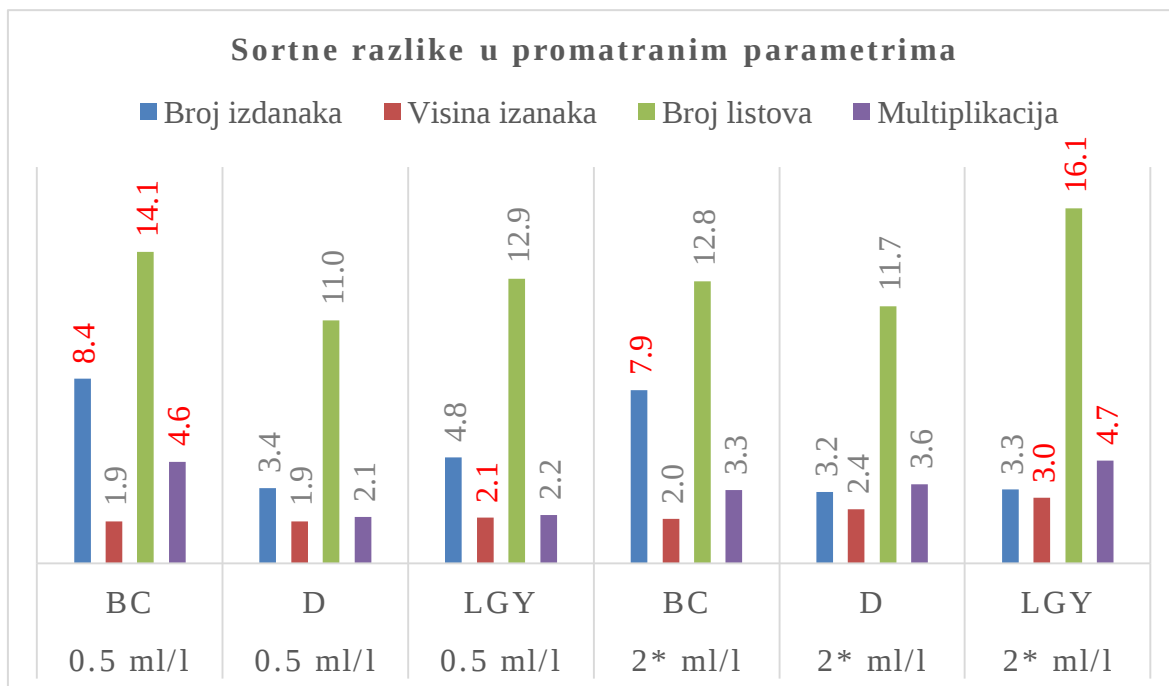
Slika 19. Kultivar Legacy pri tretanima A - 0.5 ml/l, B – 1 ml/l, C - 2 ml/l, D - 2* ml/l
(Foto: Bošnjak, 2019)

4.4. Rezultati sortnih razlika između promatranih parametara po tretmanima 0.5 i 2* ml/l

Kako je prema prethodno iznesenim rezultatima tretman s 0.5 i 2* ml/l rezultirao najbolje ispoljenim svojstvima promatranih parametara, ovdje iznosimo razlike između kultivara samo za te tretmane (0.5 i 2* ml/l).

Pri koncentraciji od 0.5 ml/l zeatina kultivar Bluecrop (Grafikon 6.) rezultirao je najvećim brojem izdanaka (8.4), zatim Legacy (4.8) i Duke (3.4). Visina izdanaka na kultivaru Legacy bila je najveća (2.1), a kultivari Bluecrop i Duke razvili su podjednaku visinu izdanaka (1.9). Najveći broj listova ispoljio je kultivar Bluecrop (14.1), zatim Legacy (12.9) te Duke (11.0). Multiplikacija je najveća bila na kultivaru Bluecrop (4.6), zatim Legacy (2.2) i Duke (2.1).

Pri koncentraciji s autoklaviranim zeatinom 2* ml/l (Grafikon 6.) najveći broj izdanaka rezultirao je također kultivar Bluecrop (7.9), zatim Legacy (3.3) i Duke (3.2). Visina izdanaka bila je najveća kod kultivara Legacy (3.0), zatim Duke (2.4) i Legacy (2.0). Najveći broj listova zabilježen je kod kultivara Legacy (16.1), zatim Bluecrop (12.8) i Duke (11.7). Multiplikacija je najveća kod kultivara Legacy (4.7), zatim Duke (3.6) i Bluecrop (3.3).



Grafikon 6. Razlika između sorti u promatranim parametrima po tretmanima 0.5 i 2* ml/l zeatina

5. RASPRAVA

Na razini cijelog pokusa (tablica 3.) kultivar Legacy rezultirao je značajno većom visinom izdanaka (2.35) i brojem listova (14.06) u odnosu na oba kultivara. Broj izdanaka (4.17) bio je značajno manji u odnosu na kultivar Bluecrop, ali značajno veći u odnosu na kultivar Duke. Nema značajne razlike u multiplikaciji (2.71) između Legacy i ostala dva kutivara u istraživanju.

Kultivar Bluecrop razvio je značajno veći broj izdanaka (7.16) u odnosu na oba ostala kultivara. Visina izdanaka (1.76) bila je značajno manja u odnosu na ostala dva kultivara. Broj listova (12.52) značajno je veći u odnosu na kultivar Duke, ali i značajno manji u odnosu na kultivar Legacy. Multiplikacija (2.81) je značajno veća u odnosu na kultivar Duke, a između kultivara Legacy nema značajnosti u multiplikaciji.

Kultivar Duke rezultirao je značajno manjim brojem izdanaka (3.32) u odnosu na oba ostala kultivara. Visina izdanaka (1.99) bila je značajno veća od kultivara Bluecrop, ali i značajno manja u odnosu na kultivar Legacy. Broj listova (10.90) je značajno manji u odnosu na oba ostala kultivara u istraživanju. Multiplikacija (2.58) značajno manja u odnosu na kultivar Bluecrop, dok nema značajne rezlike između kultivara Legacy.

Iz navedenog zaključujemo kako postoji velika sortna specifičnost, odnosno različiti odgovor kultivara na pojedine tretmane zeatinom. Tako kultivar Legacy inducira vrlo visoke izdanke koji su značajno veći od oba ostala kultivara i s značajno većim brojem listova, multiplikacija i broj izdanaka je vrlo dobar, čak odličan. Zabilježen je dosta loš odgovor kultivara Duke po pitanju broja izdanaka (značajno manji u odnosu na ostale kultivare), visine i broja listova što rezultira i vrlo malom multiplikacijom (najlošija). Kultivar Bluecrop razvio je statistički najveći broj izdanaka u odnosu na sve ostale kultivare što ujedno rezultira i vrlo velikom multiplikacijom i brojem listova, međutim izdanci su bili dosta kratki, odnosno značajno kraći u odnosu na ostale kultivare (Tablica 3.).

Tretman koji je uključivao aplikaciju jedinog autoklaviranog zeatina od 2* ml/l rezultirao je značajno većom visinom izdanaka, brojem listova i multiplikacijom, također i broj izdanaka je značajno bolji u odnosu na istu koncentraciju od 2 ml/l, ali koja nije autoklavirana (Tablica 3.).

Tablica 3. Statističke razlike na razini pokusa između: kultivara (BC - Bluecrop, D – Duke i LGY - Legacy), tretmana (koncentracija zeatina ml/l 0.5, 1, 2 i 2* autoklavirano) te interakcija kultivar x tretman za promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).

Kultivar	Broj izdanaka	Visina izdanaka	Br. listova	Multiplikacija
BC	7.16 ^A	1.76 ^C	12.52 ^B	2.82 ^A
D	3.32 ^C	1.99 ^B	10.90 ^C	2.58 ^B
LGY	4.17 ^B	2.35 ^A	14.06 ^A	2.71 ^{AB}
<i>F-test</i>	58.90	37.09	53.89	3.35
<i>p</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Tretman				
0.5 ml	5.54 ^A	1.96 ^C	12.71 ^B	2.97 ^B
1 ml	5.29 ^A	1.47 ^D	11.06 ^C	1.68 ^D
2 ml	3.88 ^B	2.25 ^B	12.66 ^B	2.32 ^C
2 ml*	4.81 ^A	2.47 ^A	13.55 ^A	3.85 ^A
<i>F-test</i>	5.82	60.29	17.43	145.71
<i>p</i>	0.0006	<.0001	<.0001	<.0001
Interakcija kultivar x tretman				
<i>F-test</i>	2.46	7.90	6.96	56.43
<i>p</i>	0.0232	<.0001	<.0001	<.0001

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

Prema tablici 4. kultivar Bluecrop jedini je inducirao značajno veći broj izdanaka u odnosu na ostale kultivare pri svim tretmanima zeatinom (0.5, 1, 2 i 2* ml/l). Nije utvrđena značajna razlika u broju izdanaka između kultivara Duke i Legacy. Nema značajne razlike u visini izdanaka između kultivara pri koncentracijama 0.5 i 1 ml/l. Značajna razlika u visini izdanaka utvrđena je pri koncentraciji zeatina od 2 i 2* ml/l gdje je kultivar Legacy razvio značajno veće izdanke u odnosu na ostale kultivare. Također, kultivar Duke inicirao je značajno veće izdanke u odnosu na kultivar Bluecrop. Kultivar Legacy inicirao je značajno veći broj listova u odnosu na ostale kultivare pri svim tretmanima zeatinom, jedino pri koncentraciji od 0.5 ml/l nema značajne razlike u broju listova s kultivarom Bluecrop. Multiplikacija pri koncentraciji, odnosno tretmanu 0.5 ml/l značajno je veće na

kultivaru Bluecrop, pri tretmanu 1ml/l kod kultivara Duke, na tretmanu 2 ml/l kultivari Duke i Legacy inicirali su značajno veću multilikaciju u odnosu na kultivar Bluecrop, te pri tretmanu s autoklaviranim zeatinom 2* ml/l na kultivaru Legacy značajno je veća multiplikacija (Tablica 4).

Tablica 4. Razlike između kultivara za tretman zeatinom od 0.5, 1, 2 i 2* ml/l za promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).

	Broj izdanaka	Visina izdanaka	Br. listova	Multiplikacija
0.5 ml/l				
BC	8.38 ^A	1.90	14.14 ^A	4.62 ^A
D	3.42 ^B	1.90	11.04 ^B	2.09 ^B
LGY	4.82 ^B	2.06	12.93 ^A	2.20 ^B
<i>F-test</i>	15.71	1.26	11.20	60.92
<i>p</i>	<.0001	0.2873	<.0001	<.0001
1 ml/l				
BC	7.36 ^A	1.39	10.96 ^B	1.71 ^B
D	3.52 ^B	1.51	10.21 ^B	2.07 ^A
LGY	4.98 ^B	1.50	12.01 ^A	1.25 ^C
<i>F-test</i>	10.43	1.37	6.36	43.25
<i>p</i>	<.0001	0.2564	0.0023	<.0001
2 ml/l				
BC	5.02 ^A	1.76 ^C	12.16 ^B	1.65 ^B
D	3.10 ^B	2.10 ^B	10.65 ^C	2.57 ^A
LGY	3.52 ^B	2.87 ^A	15.18 ^A	2.75 ^A
<i>F-test</i>	5.17	26.84	22.97	30.40
<i>p</i>	0.0068	<.0001	<.0001	<.0001
2* ml/l				
BC	7.86 ^A	2.00 ^C	12.82 ^B	3.31 ^B
D	3.24 ^B	2.44 ^B	11.68 ^B	3.58 ^B
LGY	3.34 ^B	2.96 ^A	16.14 ^A	4.66 ^A
<i>F-test</i>	53.75	14.63	31.98	23.02
<i>p</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

Kultivar Bluecrop - razvio je značajno manji broj izdanaka jedino pri tretmanu od 2 ml/l zeatina, između ostalih tretmana nema značajne razlike u broju izdanaka. Visina izdanaka značajno je manja jedino pri tretmanu 1 ml/l. Između ostalih tretmana nema značajne razlike u visini izdanaka. Jedino je tretman 0.5ml/l. razvio značajno veći broj listova i multiplikaciju u odnosu na ostale tretmane zeatinom (Tablica 5.).

Tablica 5. Razlike između tretmana zeatinom 0.5, 1, 2 i 2* ml/l unutar kultivara BC, D i LGY za promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).

	Broj izdanaka	Visina izdanaka	Br. listova	Multiplikacija
BC				
0.5 ml/l	8.38 ^A	1.90 ^A	14.13 ^A	4.61 ^A
1 ml/l	7.36 ^A	1.39 ^B	10.95 ^C	1.71 ^C
2 ml/l	5.02 ^B	1.76 ^A	12.16 ^{BC}	1.65 ^C
2* ml/l	7.86 ^A	1.99 ^A	12.82 ^B	3.30 ^B
<i>F-test</i>	3.32	9.74	8.53	66.53
<i>p</i>	0.0208	<.0001	<.0001	<.0001
D				
0.5 ml/l	3.42	1.90 ^B	11.04 ^{AB}	2.09 ^C
1 ml/l	3.52	1.50 ^C	10.21 ^B	2.06 ^C
2 ml/l	3.10	2.09 ^B	10.65 ^B	2.56 ^B
2* ml/l	3.24	2.44 ^A	11.68 ^A	3.58 ^A
<i>F-test</i>	0.68	23.62	3.54	50.81
<i>p</i>	0.5626	<.0001	0.0156	<.0001
LGY				
0.5 ml/l	4.82 ^A	2.05 ^B	12.93 ^B	2.20 ^C
1 ml/l	4.98 ^A	1.49 ^C	12.01 ^B	1.24 ^D
2 ml/l	3.52 ^B	2.87 ^A	15.17 ^A	2.75 ^B
2* ml/l	3.34 ^B	2.95 ^A	16.13 ^A	4.66 ^A
<i>F-test</i>	6.36	34.17	15.23	158.50
<i>p</i>	0.0004	<.0001	<.0001	<.0001

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq$

Kultivar Duke - nije zabilježena značajna razlika u broju izdanaka između tretmana. Tretman s autoklaviranim zeatinom 2* ml/l inicirao je značajno veće izdanke, broj listova i multiplikaciju u odnosu na ostale tretmane (Tablica 5.).

Kultivar Legacy – pri tretmanima s 0.5 i 1 ml/l zeatina razvio je značajno veći broj izdanaka u odnosu na ostale tretmane, ali veličina izdanka, broj listova i multiplikacija značajno je veća pri koncentracijama od 2 i 2* ml/l zeatina (Tablica 5.).

6. ZAKLJUČAK

Cijelo istraživanje provedeno je bez kritičnih faza i utjecaja kontaminanata tijekom procesa mikropropagacije. Utvrđena je značajna varijabilnost između sorata u odgovoru na primijenjene tretmane.

Kultivar Bluecrop

- Razvio je značajno veći broj izdanaka u odnosu na ostale kultivare što ujedno rezultira i vrlo velikom multiplikacijom i brojem listova, međutim izdanci su bili značajno kraći u odnosu na ostale ispitivane kultivare.
- Razvio je značajno manji broj izdanaka jedino pri tretmanu od 2 ml/l zeatina, između ostalih tretmana nema značajne razlike u broju izdanaka. Visina izdanaka značajno je manja, jedino pri tretmanu 1 ml/l. Između ostalih tretmana nema značajne razlike u visini izdanaka. Jedino je tretman 0.5ml/l. razvio značajno veći broj listova i multiplikaciju u odnosu na ostale tretmane zeatinom.

Kultivar Duke

- Zabilježen je dosta loš odgovor kultivara Duke po pitanju broja izdanaka (značajno manji u odnosu na ostale kultivare), visine i broja listova što rezultira i vrlo malom multiplikacijom (najlošija).
- Nije zabilježena značajna razlika u broju izdanaka između tretmana. Tretman s autoklaviranim zeatinom 2* ml/l inicirao je značajno veće izdanke, broj listova i multiplikaciju u odnosu na ostale tretmane.

Kultivar Legacy

- Inducira vrlo visoke izdanke koji su značajno veći od ostalih kultivara i s značajno većim brojem listova, a multiplikacija i broj izdanaka je također zadovoljavajući.
- Pri tretmanima s 0.5 i 1 ml/l zeatina razvio je značajno veći broj izdanaka u odnosu na ostale tretmane, ali veličina izdanaka, broj listova i multiplikacija značajno je veća pri koncentracijama od 2 i 2* ml/l zeatina.

Tretmani zeatinom

- Tretman koji je uključivao aplikaciju autoklaviranog zeatina (2* ml/l) rezultirao je značajno većom visinom izdanaka, brojem listova i izdanaka te multiplikacijom.
- Također, tretmani 0.5 i 2 ml/l zeatina inicirali su vrlo dobre rezultate po pitanju promatranih parametara.
- Najlošiji rezultati dobiveni su pri tretmanu 1 ml/l zeatina.

Stabilnost i učinkovitost zeatina nakon autoklaviranja medija u našem istraživanju nije dovedena u pitanje izlaganjem visokim temperaturama i tlaku tijekom procesa autoklaviranja. Obogaćivanje medija dodavanjem zeatina putem syringe filtera značajno poskupljuje tehnološki proces. Opetovana manipulacija i korištenje syringe filtera može uzrokovati naknadnu kontaminaciju uslijed ljudskog faktora ili neispravnosti (neadekvatna propusnost ili oštećenje membrane).

Daljnja istraživanja usmjeriti u ispitivanje mogućnosti kombinacije različitih auksina (IBA, IAA, NAA, itd.) s citokininima (zeatin, 2iP, TDZ, itd.) s ciljem poboljšanja mikropropagacije borovnice. Također, napraviti analizu medija da bi se utvrdila postojanost koncentracije zeatina nakon autoklaviranja.

7. LITERATURA

- Adams, L.S.; Phung, S.; Yee, N.; Seeram, N.P.; Li, L.; Chen, S. 2010. Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Res.*, 70(9), 3594-3605.
- Adelberg, J. 2006. Agitated, thin-films of liquid media for efficient micropropagation. Pages 101-117 in S. Dutta, S. Gupta, and Y. Ibaraki, eds. *Engineering for plant tissue*.
- Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Takayama, S. 1995. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. Pages 118 in J. Aitken-Christie, T. Kozai, and M. A. L. Smith, eds. *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Anderson, W.C. 1975. Propagation of rhododendrons by tissue culture. Part I: Development of a culture medium for multiplication of shoots. *Comb. Proc. Int. Plant*.
- Araújo, R.C., and Bruckner, C.H. (2008). *Biologia reprodutiva de fruteiras*. In *Fundamentos do Melhoramento de Fruteiras*, C.H. Bruckner, ed. (Viçosa, Brazil: UFV).
- Arencibia, A. D., Bernal, A., Yang, L., Cortegaza, L., Carmona, E. R., Pérez, A., Hu, C. J., Li, Y. R., Zayas C. M. and Santana, I. 2008. New Role of Phenylpropanoid Compounds during Sugarcane Micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Sciences*, Vol. 175, No. 4, pp. 487-496.
- Arencibia, A. D., Gonzales, G. R. 2013. An Approach for Micropropagation of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Plants Mediated by Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *American Journal of Plant Sciences*, 2013, 4, 1022-1028.
- Atalay, M.; Gordillo, G.; Roy, S.; Rovin, B.; Bagchi, D.; Bagchi, M.; Sen, C.K. 2003. Anti-angiogenic property of edible berry in a model of hemangioma. *FEBS Lett.*, 544(1-3), 252-257.
- Barker, W.G. and W.B. Collins. 1963. The blueberry rhizome: In vitro culture. *Can. J. Bot.* 41:1325-1329.

Bernal, A., Machado, P., Carmona, E. R., Rivero, O., Cortegaza, L., Cabrera, M., Zayas, C. M., Nodarse, O., Santana I. and Arencibia, A. D. 2008. Priming and Biopriming Integrated into the Sugarcane Micropropagation Technology by Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Sugar Technology*, Vol. 10, No. 1, pp. 42-47.

Billings, S.G., C.K. Chin, and G. Jelenkovic. 1988. Regeneration of blueberry plantlets from leaf segments. *HortScience* 23:763-766, 1988.

Boivin, D.; Blanchette, M.; Barrette, S.; Moghrabi, A.; Béliveau, R. 2007. Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced Activation of NF- κ B by edible berry juice. *Anticancer Res.*, 27(2), 937-48.

Brissette, L., L. Tremblay, and D. Lord. 1990. Micropropagation of lowbush blueberry from Mature Field-grown Plants. *HortScience* 25(3):349-351.

Bryla, David & Strik, Bernadine. (2007). Effects of Cultivar and Plant Spacing on the Seasonal Water Requirements of Highbush Blueberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. American Society for Horticultural Science. 132(2) • March 2007.

Callow, P., K. Haghighi, M. Giroux, and J. Hancock. 1989. In vitro shoot regeneration on leaf tissue from micro-propagated highbush blueberry. *Hortscience* 24:373-375.

Campos, A.D., Antunes, L.E.C., Rodrigues, A.C., and Ueno, B. (2005). Enraizamento de Estacas de Mirtilo Provenientes de Ramos Lenhosos Comunicado técnico, 133) (Pelotas: Embrapa Clima Temperado).

Cao, X. and F.A. Hammerschlag. 2000. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. *HortScience* 35:945–947.

Cao, X., F.A. Hammerschlag, and L. Douglass. 2002. A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. Bluecrop. *HortScience* 37:819-821.

Chakrabarty, D., Hahn, E. J., Yoon, Y. S., and Paek, K. Y. 2003. Micropropagation of Apple Root Stock ‘M9 EMLA’ Using Bioreactor. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Vol. 78, No. 5, pp. 605-609.

- Chandler, C.K. and A.D. Draper. 1986. Effect of zeatin and 2iP on shoot proliferation of three highbush blueberry clones in vitro. HortScience 21:1065-1066.
- Cohen, D. 1980. Application of micropropagation methods for blueberries and tamarillos. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:144-146.
- Cohen, D. and D. Elliot. 1979. Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 29:177-179.
- Dean, B.P. (ed.). 2000. Wild fruits: Thoreau's rediscovered lost manuscript. Norton, New York, NY.
- Debnath, S. C. 2010. Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation- A review. Can. J. Plant Sci. (2011) 91: 147-157.
- Debnath, S.C. 2004. In vitro culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). Small Fruits Review 3: 393–408.
- Debnath, S.C. and K.B. McRae. 2001b. In vitro culture of lingonberry (*Vaccinium vitis idaeae* L.). Small Fruits Review 1(3):3-19.
- Detrez, C., Ndiaye, S. and Dreyfus, B. 1994. In vitro regeneration of the tropical multipurpose leguminous tree *Sesbania grandiflora* from cotyledon explants. Plant Cell Rep. 14: 87-93.
- Dujmović Purgar, D., Šindrak, Z., Mihelj, D., Voća, S. i Duralija, B. (2007). Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj. Pomologia Croatica, 13 (4), 219-228.
- Duralija, Boris, Aleksandar Mešić, and Mario Njavro. "Berry fruit industry in Croatia." 29th International Horticultural Congress. 2014.
- Dweikat, M. and P.M. Lyrene. 1988. Adventitious shoot production from leaves of blueberry cultured in vitro. HortScience 23: 629.
- Ebert G. 2008. Uzgoj borovnica i brusnica. ITD Gaudeamus d.o.o, Požega.
- Eccher, T. and N. Noè. 1989. Comparison between 2iP and zeatin in micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*). Acta Hort. 241: 185-190.

Ehlenfeldt, M.K.; Prior, R.L. 2001. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Phenolic and Anthocyanin Concentrations in Fruit and Leaf Tissues of Highbush Blueberry. *J. Agric. Food Chem.*, 49(5), 2222-7.

El-Shiekh, A., D.K. Wildung, J.J. Luby, K.L. Sargent, and P.E. Read. 1996. Long-term effects of propagation by tissue culture or softwood single-node cuttings on growth habit, yield, and berry weight of 'northblue' blueberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121: 339-342.

Escodo, P. 2018. GLOBAL BERRY MARKET Trends & opportunities. EUROFRESH DISTRIBUTION magazine. Huelva, June 20th 2018.

Etienne, H., Berthouly, M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 215-231.

Frett, J.J. and J.M. Smagula. 1983. In vitro shoot production of lowbush blueberry. *Can. J. Plant Sci.* 63: 467-472.

Gajdošova, A., Ostrolucka, M.G., Libiakova, G., Ondrušková, E. and Šimala, D. 2006. Microconal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture in vitro. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 14:103-119.

George, E.F. and Sherrington, P.D. (1984) *Plant Propagation by Tissue Culture—Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Exegetics Ltd., Edington.

Gonzalez, M.V., Lopez, M., Valdez, A.E. and Ordas, R.J. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-growing plants. *Ann. Appl. Biol.* 137:73-78.

Gough, R. E., V. G. Shutak i N. D. Windus. 1976. Observation on vegetative and reproductive growth in blueberry. *Hortscience* 11: 260-261.

Gough, R.E. and V.G. Shutak. 1978. Anatomy and morphology of cultivated highbush blueberry. *Rhode Island Agricultural Experimentation Bulletin*.

Gough, R.E. i sur. 1978. Growth and development of highbush blueberry. I. Vegetative growth. *Journal American Society for Horticultural Science* 103: 94-97.

Gough, R.E., 1993. *The Highbush managment and its management*. The Haworth Press-Food Product Press, New York.

- Grout, J.M. and P.E. Reed. 1986. Influence of stock plant propagation method on tissue culture and leaf-bud propagation of 'Northblue' blueberry. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111:368-371.
- Gupta, S.C.; Kim, J.H.; Prasad, S.; Aggarwal, B.B. 2010. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. Cancer Metastasis Rev., 29(3), 405-34.
- Hruskoci, J.B. and P.E. Read. 1993. In vitro shoot regeneration from internode segments and internode-derived callus of blueberry (*Vaccinium* spp.). Acta Hort. 346:125-130.
- Hummer, K. E. 2013. Manna in Winter: Indigenous Americans, Huckleberries and Blueberries. Hortscience vol. 48(4) April 2013.
- Ibaraki, Y. and Kurata, K. 2001. Automation of Somatic Embryo Production. Plant Cell Tissue and Organ Culture, Vol. 65, No. 3, pp. 179-199.
- Janick, J. and Ziv, M. 2000. Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. Horticulture Review, Vol. 24, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Jelaska, S. 1994. Kultura biljnih stanica i tkiva. Školska knjiga, Zagreb.
- Jiang Y., Yu H. Zhang D., He S. and Wang Ch. (2009) Influences of media and cytokinins on shoot proliferation of 'Brightwell' and 'Choice' blueberries in vitro. Acta Horticulturae, 810, pp. 581-586
- Johnson, S. A., Arjmandi, B.H. 2013. Evidence for Anti-Cancer Properties of Blueberries: A Mini-Review. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2013, 13, 1142-1148.
- Kalt W., Joseph, W. A., Shukitt-Alle, B. 2007. Blueberries and human health: a review of current research. Journal of American Pomological Society 61 (3): 151-160.
- Kalt, W.; Ryan, D.A.; Duy, J.C.; Prior, R.L.; Ehlenfeldt, M.K.; Vander Kloet, S.P. 2001. Interspecific Variation in Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity among Genotypes of Highbush and Lowbush Blueberries (*Vaccinium* Section *cyanococcus* spp.). J. Agric. Food Chem., 49(10), 4761-7.

Kozai, T., Jeong, R., Kubota, C. and Murai, Y. 1995. Effects of Volume and Initial Strength of Medium on the Growth, Photosynthesis and Ion Uptake of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plantlet in Vitro,” Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, Vol. 64, No. 1,, pp. 63-71.

Krewer, G. K. and W. O. Cline. 2003. Blueberry Propagation Suggestions.

Leifert, C., Murphy, K. P. and Lumsden, P. J. 1995. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 14: 83-109.

Levin, R. and I.K. Vasil. 1989. An integrated and automated tissue culture system for mass propagation of plants. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 25:21–27.

Litwińczuk W. and Wadas M. (2008) Auxin-dependent development and habituation of highbush blueberry (*Vaccinium × coveilleum* But. Et Pl.) 'Herbert' in vitro shoot cultures. Scientia Horticulturae, 119, pp.41-48.

Litwińczuk, W. and J. Szczerba. 1998. The growth and development of highbush blueberry cultures (*Vaccinium corymbosum* L. Cv. Bluecrop) under different light sources. Acta Physiologiae Plantarum 20: 24

Litwińczuk, W., & Wadas-Boroń, M. (2009). Development of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* hort. non L.) in vitro shoot cultures under the influence of melatonin. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus 8 (3), 8.

Liu, Y. Zambrano, C. J. Hu, E. R. Carmona, A. Bernal, A. Pérez, Y. R. Li, A. Guerra, I. Santana and A. D. Arencibia. 2010. Sugarcane Metabolites Produced in CO₂-Rich Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) Induce Tomato (*Solanum lycopersicum*) Resistance against Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*). In Vitro Cell Development Plant, Vol. 46, No. 6, 2010, pp. 558- 568.

Lloyd G. and McCown (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. B., Int. Plant Prop. Soc. Proc. 30, 421.

Lorenzo, J. C., Gonzalez, B. L., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P. and Borroto, C. 1998. Sugarcane Shoots Formation in an Improved Temporary Immersion System, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 54, No. 3, pp. 197-200.

Lyrene, P.M. 1978. Blueberry callus and shoot-tip culture. Proc. Florida State Hort. 91, 171-172.

- Lyrene, P.M. 1980. Micropropagation of rabbiteye blueberries. *HortScience* 15:80-81.
- Lyrene, P.M. 1981. Juvenility and production of fast-rooting cuttings from blueberry shoot cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106:396-398.
- M. Escalona, G. Samson, C. Borroto and Y. Desjardins "Physiology of Effects of Temporary Immersion Bioreactors on Micropropagated Pineapple Plantlets," *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, Vol. 39, No. 6, 2003, pp. 651-656.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 79(5), 727-47.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 81(1 Suppl), 230S-242S.
- Miljković, I. 1991. *Suvremeno voćarstvo*. Znanje, Zagreb.
- Mohamed, G. R. A. E., Hugo, B., Zavdetovna, K. L., and Arnoldovna, T. O. (2018). A research approach supporting micropropagation and domestication of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Egypt. *Eurasia J Biosci* 12, 205-2010.
- Moore, J.N. 1994. The blueberry industry of North America. *HortTechnology* 4:96–102.
- Morrison, S., J.M. Smagula, and W. Litten. 2000. Morphology, growth, and rhizome development of *Vaccinium angustifolium* Ait. seedlings, rooted softwood cuttings, and micropropagated plantlets. *HortScience* 35: 738-741.
- Murashige, T; Skoog, F (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473–497.
- Nickerson, N.L. 1978. In vitro shoot formation in lowbush blueberry seedling explants. *HortScience* 13:698.
- Nickerson, N.L. and I.V. Hall. 1976. Callus formation in stem internode sections of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) cultured on a medium containing plant growth regulators. *Horticultural Research* 16, 29-35.

Nitsch, J.P. 1965. Culture in vitro de tissus de fruits. III. Mesocarpe et endocarpe de peche. Bull. Soc. Bot. Fr. 112, 22-25.

Noè N. and T. Eccher. 1994. Influence of irradiance on in vitro growth and proliferation of *Vaccinium corymbosum* (highbush blueberry) and subsequent rooting in vivo. *Physiol. Plant.* 91:273-275.

Orlikowska, T. 1986. Micropropagation of highbush blueberry. *Fruit Sci. Rep.* 13:105-115.

Ostrolucka, M.G., Gajdošova, A. and Libiakova, G. 2002. Influence of zeatin on microclonal propagation of *Vaccinium corymbosum* L. *Propag. Ornam. Plants* 2:14-18

Ostrolucka, M.G., Gajdošova, A., Libiakova, G., Hrubikova, K. and Bežo, M. 2007. Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. p.445-455. In: S.M. Jain and H. Haggman (eds.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, The Netherlands.

Paek, K. Y., Chakrabarty, D. and Hahn, E. J. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81: 287-300.

Pan, M.H.; Chang, Y.H.; Badmaev, V.; Nagabhushanam, K.; Ho, C.T. Pterostilbene induces apoptosis and cell cycle arrest in human gastric carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55(19), 7777-7785.

Pavlina, R. (1994). Mikropropagacija: mogućnosti njene primjene u hrvatskoj poljoprivredi. *Sjemenarstvo*, 11 (5), 317-326.

Piao, X. C., Chakrabarty, D., Hahn E. J., and Paek, K. Y. 2003. A Simple Method for Mass Production of Potato Microtubers Using a Bioreactor System. *Current Science*, Vol. 84, No. 8, pp. 1129-1132.

Pierik, R. L. M. 1991. Micropropagation of ornamental plants. *Acta Horticulture* 289, 45-55.

Ramage, C. M. and Williams, R. R. 2003. Mineral uptake in tobacco leaf disks during different developmental stages of shoot organogenesis. *Plant Cell Rep.* 21: 1047-1053.

Reed, B.M. and Abdelnour-Esquivel, A. 1991. The use of zeatin to initiate in vitro cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience* 26:1320-1322.

Retamales, J. B., Hancock, J. F. (2012). *Blueberries: Volume 21 of Crop production science in horticulture* (1st ed.). Cambridge, MA: Centre for Agriculture and Bioscience International (CABI).

Rowland, L.J. and E.I. Ogden. 1992. Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of highbush blueberry. *HortScience* 27:1127-1129.

Roy, S.; Khanna, S.; Alessio, H.M.; Vider, J.; Bagchi, D.; Bagchi, M.; Sen, C.K. 2002. Anti-angiogenic property of edible berries. *Free Radic. Res.*, 36(9), 1023-1031.

Ruzic, Djurdjina & Vujović, Tatjana & Cerović, R. & Ostrolucka, M.G. & Gajdošová, A.. (2012). Micropropagation in vitro of highbush blueberry (*vaccinium corymbosum* L.). *Acta Horticulturae*. 265-272. 10.17660/ActaHortic.2012.926.36.

Debnath S. C. 2009. "A Scale-Up System for Lowbush Blue- berry Micropropagation Using a Bioreactor," *HortScience*, Vol. 44, No. 7, , pp. 1962-1966.

Debnath, S.C. (2007) Propagation of *Vaccinium* in Vitro , *International Journal of Fruit Science*, 6:2, 47-71.

Sedlak, J. & Paprstein, Frantisek. (2009). In vitro multiplication of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Acta Horticulturae*. 810. 575-580. 10.17660/ActaHortic.2009.810.76.

Seeram, N.P.; Adams, L.S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H.S.; Heber, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54(25), 9329-9339.

Sellappan, S.; Akoh, C.C.; Krewer, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50(8), 2432-8.

Shutak, V. G., R. E. Gough and N. D. Windus. 1980. The cultivated highbush blueberry: twenty years of reseach. *Rhode Island Agricultural Experiment Station bulletin* 428.

Smith, D. R. 1986. *Biotechnology in agriculture and forestry* 2, *Trees* 1, Springer-Verlag, Berlin.

- Srivastava, A.; Akoh, C.C.; Fischer, J.; Krewer, G. 2007. Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of georgia-grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 55(8), 3180-3185.
- Strik, B. C. 2007. Horticultural Practices of Growing Highbush Blueberries in the Ever-Expanding U.S. and Global Scene. *Journal of the American Pomological Society* 61(3):148-150 2007.
- Šoškić, M. 2008. *Savremeno voćarstvo*. Partenon, Beograd.
- Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Sugimoto, Y. and Kunitake, H. 2008. Evaluation of basal media for micropropagation of four blueberry cultivars. *Sci. Hortic.* 119:72-74.
- Uttal, L.J. 1986. An older name for *Vaccinium australe* Small. *Castanea* 51:221-224
- Vander Kloet, S. P.1980. The taxonomy of the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum*. *Canadian Journal of Botany*, 58(10): 1187-1201.
- White, P.R. 1943. *A handbook of plant tissue culture*. The Jacques Cattell Press, Lancaster, Penn.
- Wolfe, D.E., P. Eck, and C. Chin. 1983. Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. *HortScience* 18:703-705.
- Wolfe, K.L.; Kang, X.; He, X.; Dong, M.; Zhang, Q.; Liu, R.H. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56(18), 8418-8426.
- Xie, C.; Kang, J.; Ferguson, M.E.; Nagarajan, S.; Badger, T.M.; Wu, X. 2011.. Blueberries reduce pro-inflammatory cytokine TNF-and IL-6 production in mouse macrophages by inhibiting NFB activation and the MAPK pathway. *Mol. Nutr. Food Res.*, 55(10), 1587-91.
- Yi, W.; Fischer, J.; Krewer, G.; Akoh, C.C. 2005. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J. Agric. Food Chem.*, 53(18), 7320-7329.
- Zimmerman, R.H. 1987. Micropropagation of woody plants: Post tissue culture aspects. *Acta Hort.* 227:489-499.

Zimmerman, R.H. and O.C. Broome. 1980. Blueberry micropropagation, pp. 44-47.

Ziv, M. 1991a. Quality of micropropagated plants -vitrification. In *Vitro Cell. Dev. Biol.* 27: 64-69.

Ziv, M. 1991b. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. Pages 45-69 in P. C. Debergh and R. H. Zimmerman, eds. *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Ziv, M., Chen, J. and Vishnevetsky, J. 2003. Propagation of plants in bioreactors: prospects and limitations. *Acta Hortic.* 616: 85-93.

Internetski izvori:

<http://bonap.net/MapGallery/County/Vaccinium%20angustifolium.png>

http://extension.missouri.edu/blueberry/documents/Shared_Documents/MOBBSchool/MOBBSchoolConf11/Blueberry%20establishment%20MO%2010_7_11%20STRIK.pdf

http://gardenstatelegacy.com/files/The_Blueberry_Born_&_Bred_in_NJ_Knackmuhs_GSL5.pdf

<http://hort.uconn.edu/detail.php?pid=517>

<http://temperate.theferns.info/plant/Vaccinium+formosum>

<http://www.farmingportal.co.za/index.php/agri-index/68-crops/1347-overview-global-blueberry-market-january-2019>

<http://www.foodreference.com/html/a-blueberry-history.html>

<http://www.himedialabs.com/TD/PT026.pdf>

<http://www.indepthinfo.com/blueberries/history.htm>

http://zgs.zrc.sazu.si/Portals/8/Geografski_vestnik/Pred1999/GV_0102_113_123.pdf

<https://aggie-horticulture.tamu.edu/extension/fruit/blueberry/blueberries.html>

<https://agresearchmag.ars.usda.gov/2011/may/nal>

<https://articles.extension.org/pages/61630/anatomy-of-a-blueberry-plant>

https://en.wikipedia.org/wiki/Vaccinium_angustifolium

https://en.wikipedia.org/wiki/Vaccinium_corymbosum#Cultivation

https://en.wikipedia.org/wiki/Vaccinium_virgatum

<https://en.wikipedia.org/wiki/Zeatin>

<https://extension.oregonstate.edu/produce-forage/berries-grapes/blueberry-plant-physiology>

<https://hr.wikipedia.org/wiki/Borovnica>

<https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Vaccinium+formosum>

<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VAAN>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trans-zeatin#section=13C-NMR-Spectra>

<https://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/borovnica-2/>

<https://www.blueberrycouncil.org/about-blueberries/history-of-blueberries/>

<https://www.fallcreeknursery.com/commercial-fruit-growers/varieties/bluecrop>

<https://www.fallcreeknursery.com/commercial-fruit-growers/varieties/duke>

<https://www.farmingportal.co.za/index.php/agri-index/68-crops/1347-overview-global-blueberry-market-january-2019>

<https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/shrub/vacang/all.html>

<https://www.gardenia.net/plant/Vaccinium-Duke>

<https://www.scribd.com/doc/315060465/BOROVNICA-OSNOVNO>

8. SAŽETAK

Borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) predstavlja voćnu kultura koja je u RH po svojoj intenzivnoj proizvodnji zanemariva i relativno je nova intenzivna kultura. Mikropropagacija osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog sadnog materijala u kratkom vremenskom intervalu jer se proizvodnja odvija u kontroliranim i aseptičnim uvjetima. Istraživanje je provedeno na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* - laboratorij za voćarstvo). U ovom istraživanju uspoređivan je utjecaj određenih koncentracija hormona zeatina (0.5, 1, 2 i 2* ml/l) na uspješnost multiplikacije i morfološke karakteristike 3 privredno značajna kultivara visokogrmolike borovnice (Duke, Bluecrop i Legacy). Utvrđena je značajna varijabilnost između sorti u odgovoru na primijenjene tretmane. Tretman koji je uključivao aplikaciju autoklaviranog zeatina (2* ml/l) rezultirao je značajno većom visinom izdanaka, brojem listova i izdanaka te multiplikacijom. Također, tretmani 0.5 i 2 ml/l inicirali su vrlo dobre rezultate po pitanju promatranih parametara. Najlošiji rezultati dobiveni su pri tretmanu 1 ml/l. Daljnja istraživanja usmjeriti u ispitivanje mogućnosti kombinacije različitih auksina i citokinina s ciljem poboljšanja mikropropagacije borovnice. Također, napraviti analizu medija da bi se utvrdila postojanost koncentracije zeatina nakon autoklaviranja.

Ključne riječi: borovnica, mikropropagacija, zeatin, multiplikacija

9. SUMMARY

Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is a fruit culture which in its intensive production insignificant in the RH and presents a relatively new intensive culture. Micropropagation ensures the production of high quality and phytosanitary safe planting material within a short time interval because the production takes place in controlled and aseptic conditions. The research was conducted at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek, Department of Pomology, Viticulture and Enology (in vitro - Pomology laboratory). The influence of specific concentrations of zeatin hormone (0.5, 1, 2, and 2* ml/l) was compared against multiplication rate and morphological characteristics of 3 economically significant cultivars of highbush blueberries (Duke, Bluecrop and Legacy). Significant variability was found between varieties in response to applied treatments. Treatment that included application of autoclaved zeatin (2* ml/l) resulted in significantly higher shoot height, number of leaves and shoots, and multiplication. Also treatments of 0.5 and 2 ml/l initiated very good results regarding the observed parameters. The worst results were obtained with treatment of 1 ml/l. Further research should be focused on examining the possibility of combining different auxins and cytokinins with the aim of improving blueberry micropropagation. Media analysis should also be performed to determine the persistence of zeatin concentration after autoclaving.

Key words: blueberry, micropropagation, zeatin, multiplication

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Prikaz tretmana u istraživanju.....	31
Tablica 2. Sastav medija WPM.....	33
Tablica 3. Statističke razlike na razini pokusa između: kultivara (BC - Bluecrop, D – Duke i LGY - Legacy), tretmana (koncentracija zeatina ml/l 0.5, 1, 2 i 2* autoklavirano) te interakcija kultivar x tretman za promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	43
Tablica 4. Razlike između kultivara za tretman zeatinom od 0.5, 1, 2 i 2* ml/l za promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	44
Tablica 5. Razlike između tretmana zeatinom 0.5, 1, 2 i 2* ml/l unutar kultivara BC, D i LGY za promatrane parametre (broj izdanaka, visina izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	45

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Nekultivirana visokogrmolika borovnica.....	8
Slika 2. Niskogrmolika borovnica.....	9
Slika 3. Kultivirana borovnica zečje oko.....	10
Slika 4. <i>Vaccinium australe</i>	10
Slika 5. Koriijen borovnice.....	12
Slika 6. Grm i izboji borovnice u zimskom mirovanju.....	13
Slika 7. List borovnice.....	14
Slika 8. Cvat borovnice.....	15
Slika 9. Plod borovnice.....	16
Slika 10. Prostor za aklimatizaciju i matičnjak voćnih vrsta FAZOS.....	28
Slika 11. Sorta Blue crop.....	29
Slika 12. Sorta Duke.....	30
Slika 13. Sorta Legacy.....	30
Slika 14. Disekcija nodijalnih segmenata borovnice.....	32
Slika 15. Nodijalni segmenti u mediju.....	32
Slika 16. Mjerenja promatranih parametara u istraživanju.....	34
Slika 17. Kultivar Bluecrop pri tretanima A - 0.5 ml/l, B – 1 ml/l, C - 2 ml/l, D - 2* ml/l.....	37
Slika 18. Kultivar Duke pri tretanima A - 0.5 ml/l, B – 1 ml/l, C - 2 ml/l, D - 2* ml/l.....	38

Slika 19. Kultivar Legacy pri tretanima A - 0.5 ml/l, B – 1 ml/l, C - 2 ml/l, D - 2*
ml/l.....39/40

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Top 10 svjetskih proizvođača borovnice na svijetu.....	5
Grafikon 2. Kretanje svjetske proizvodnje borovnice u razdoblju 1961-2017. g.....	5
Grafikon 3. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Bluecrop.....	36
Grafikon 4. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Duke.....	38
Grafikon 5. Rezultati mjerenja promatranih parametara na kultivaru Legacy.....	39
Grafikon 6. Razlika između sorti u promatranim parametrima po tretmanima 0.5 i 2* ml/l zeatina.....	41

BASIC DOCUMENTATION CARD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij, smjer Voćarstvo

Diplomski rad

UTJECAJ SORTNE SPECIFIČNOSTI I RAVNOTEŽE HORMONA U MEDIJU NA UČINKOVITOST MIKROPROPAGACIJE BOROVNICE

Ivan Glavan

Sažetak: Borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) predstavlja voćnu kultura koja je u RH po svojoj intenzivnoj proizvodnji zanemariva i relativno je nova intenzivna kultura. Mikropropagacija osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog sadnog materijala u kratkom vremenskom intervalu jer se proizvodnja odvija u kontroliranim i aseptičnim uvjetima. Istraživanje je provedeno na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (in vitro - laboratorij za voćarstvo). U ovom istraživanju uspoređivan je utjecaja određenih koncentracija hormona zeatina (0.5, 1, 2 i 2* ml/l) na uspješnost multiplikacije i morfološke karakteristike 3 privredno značajna kultivara visokogrmolike borovnice (Duke, Bluecrop i Legacy). Utvrđena je značajna varijabilnost između sorti u odgovoru na primijenjene tretmane. Tretman koji je uključivao aplikaciju autoklaviranog zeatina (2* ml/l) rezultirao je značajno većom visinom izdanaka, brojem listova i izdanaka te multiplikacijom. Također, tretmani 0.5 i 2 ml/l inicirali su vrlo dobre rezultate po pitanju promatranih parametara. Najlošiji rezultati dobiveni su pri tretmanu 1 ml/l. Daljnja istraživanja usmjeriti u ispitivanje mogućnosti kombinacije različitih auksina i citokinina s ciljem poboljšanja mikropropagacije borovnice. Također, napraviti analizu medija da bi se utvrdila postojanost koncentracije zeatina nakon autoklavliranja.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijeku

Mentor: prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević

Broj stranica: 69

Broj grafikona i slika: 25

Broj tablica: 5

Broj literaturnih navoda: 117

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: borovnica, mikropropagacija, zeatin, multiplikacija

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv.prof.dr.sc. Vladimir Jukić, predsjednik
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor
3. doc.dr.sc. Monika Marković, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University graduate study, course Pomology

Graduate work

INFLUENCE OF VARIETAL SPECIFICITY AND HORMONE BALANCE IN MEDIUM ON BLUEBERRY MICROPROPAGATION PERFORMANCE

Ivan Glavan

Abstract: Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is a fruit culture which in its intensive production insignificant in the RH and presents a relatively new intensive culture. Micropropagation ensures the production of high quality and phytosanitary safe planting material within a short time interval because the production takes place in controlled and aseptic conditions. The research was conducted at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek, Department of Pomology, Viticulture and Enology (*in vitro* - Pomology laboratory). The influence of specific concentrations of zeatin hormone (0.5, 1, 2, and 2* ml/l) was compared against multiplication rate and morphological characteristics of 3 economically significant cultivars of highbush blueberries (Duke, Bluecrop and Legacy). Significant variability was found between varieties in response to applied treatments. Treatment that included application of autoclaved zeatin (2* ml/l) resulted in significantly higher shoot height, number of leaves and shoots, and multiplication. Also treatments of 0.5 and 2 ml/l initiated very good results regarding the observed parameters. The worst results were obtained with treatment of 1 ml/l. Further research should be focused on examining the possibility of combining different auxins and cytokinins with the aim of improving blueberry micropropagation. Media analysis should also be performed to determine the persistence of zeatin concentration after autoclaving.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević

Number of pages: 69

Number of figures and pictures: 25

Number of tables: 5

Number of references: 117

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Key words: blueberry, micropropagation, zeatin, multiplication

Reviewers:

1. Vladimir Jukić, Ph.D., assoc. prof., president
2. Aleksandar Stanisavljević, Ph.D., full. prof., mentor
3. Monika Marković, asst. prof., member

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