

# Utjecaj različitog spektra svjetla te koncentracije hormona na rast eksplantata češnjaka in vitro

---

Guberac, Sunčica

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:261562>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-19**



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**  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Sunčica Guberac, apsolvent

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**Utjecaj različitog spektra svjetla te koncentracije hormona na rast  
eksplantata češnjaka *in vitro***

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Sunčica Guberac, apsolvent

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**Utjecaj različitog spektra svjetla te koncentracije hormona na rast  
eksplantata češnjaka *in vitro***

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

Osijek, 2017.

## Sadržaj:

|        |                                            |    |
|--------|--------------------------------------------|----|
| 1.     | Uvod                                       | 1  |
| 1.1.   | Cilj istraživanja                          | 2  |
| 2.     | Pregled literature                         | 3  |
| 2.1.   | Mikrorazmnožavanje češnjaka                | 3  |
| 2.2.   | Utjecaj svjetlosti na <i>in vitro</i> rast | 6  |
| 2.3.   | Utjecaj hormona na <i>in vitro</i> rast    | 10 |
| 3.     | Materijal i metode                         | 14 |
| 3.1.   | Biljni materijal                           | 14 |
| 3.1.1. | Morfološki opis Slavanskog ozimog češnjaka | 14 |
| 3.1.2. | Morfološki opis češnjaka Vincek            | 15 |
| 3.2.   | Priprema hranjive podloge                  | 15 |
| 3.3.   | Izdvajanje i sterilizacija eksplantata     | 17 |
| 3.4.   | Uvođenje u kulturu                         | 18 |
| 3.5.   | Mjerenje i umnažanje materijala            | 20 |
| 3.6.   | Statistička obrada podataka                | 21 |
| 4.     | Rezultati i rasprava                       | 22 |
| 5.     | Zaključak                                  | 29 |
| 6.     | Popis literature                           | 30 |
| 7.     | Sažetak                                    | 37 |
| 8.     | Summary                                    | 38 |
| 9.     | Popis tablica                              | 39 |
| 10.    | Popis slika                                | 40 |
|        | Temeljna dokumentacijska kartica           | 41 |
|        | Basic documentation card                   | 42 |

## 1. Uvod

Češnjak ili bijeli luk (lat. *Allium sativum*) je jednogodišnja ili višegodišnja povrtna kultura, koja pripada porodici *Alliaceae* i rodu *Allium*. Pretpostavlja se da je domovina češnjaka srednja Azija te da potječe s područja zapadne Kine. Zbog svojih iznimnih svojstava češnjak se od pamtivyjeka upotrebljava u kulinarstvu i medicini. Češnjak sadrži preko 150 biološki aktivnih tvari, uključujući minerale, vitamine i aminokiseline. Bogat je manganom, selenom, fosforom, vitaminom C i vitaminom B6 te sadrži eterična ulja u čijem sastavu se nalazi sumpor, a koji im daje specifičan miris. Također, češnjak posjeduje mnogobrojna ljekovita svojstva te djeluje antioksidativno, protuupalno i antimikrobno (Parađiković i sur., 2015.).

Prema FAO podacima ukupna svjetska proizvodnja češnjaka 2014. godine iznosila je 24 939 965 t na površini od ukupno 1 547 381 ha. Najveći svjetski proizvođač češnjaka je Kina, koja sa proizvodnjom od 19 984 724 t čini oko 80 % ukupne svjetske proizvodnje češnjaka. Slijede ju Indija i Koreja sa proizvodnjom od 1 252 000 t i 353 761 t. Najveći europski proizvođači češnjaka su Ukrajina sa proizvodnjom od 191 140 t i Španjolska sa proizvodnjom od 177 420 t. Ukupna proizvodnja češnjaka u Hrvatskoj je 2014. godine iznosila 1 381 t na ukupnoj površini od 161 ha. U odnosu na 2013. godinu to je značajan pad budući da je 2013. ukupna proizvodnja češnjaka u Hrvatskoj iznosila 5 645 t na ukupnoj površini od 389 ha (<http://faostat3.fao.org>).

Češnjak formira lukovicu jajastog ili spljoštenog oblika, koja predstavlja reproduktivni organ biljke, a sastoji se od 10-20 malih češnjeva obavijenih čvrstom ljuskom (Parađiković i sur., 2012.). Kultivirani češnjak seksualno je sterilna kultura te se razmnožava isključivo vegetativnim putem (Novak i sur., 1990.). Vegetativno razmnožavanje naziva se još i klonskim razmnožavanjem. Glavni nedostatak vegetativnog razmnožavanja jest pojava primarne i sekundarne infekcije virusima što za posljedicu ima smanjenje prinosa i kvalitete kao i skraćivanje vijeka skladištenja lukovica (Mehta i sur., 2013.a).

Kao alternativa klasičnom vegetativnom ili klonskom razmnožavanju pojavile su se tehnike kulture tkiva i stanica. Primjena tehnika kulture tkiva i stanica u proizvodnji češnjaka započela je 70-ih godina prošloga stoljeća. Ove tehnike su se pokazale boljima u odnosu na klasičnu reprodukciju češnjevim, budući da zahtijevaju samo stanice ili male dijelove tkiva za dobivanje velikog broja biljaka (Robledo-Paz i Tovar-Soto, 2012.).

Razmnožavanje kulturom tkiva zasniva se na iskorištavanju rasta vrlo sitnih biljnih organa ili komadića tkiva u aseptičnim uvjetima. Često se upotrebljava termin kultura *in vitro* što

znači da se kulture drže u staklenim ili plastičnim posudama. Vegetativno *in vitro* razmnožavanje naziva se još i mikrorazmnožavanje jer se u početku dobivaju minijturni izdanci i biljčice (Jelaska, 1994.).

*In vitro* tehnike koriste se za klonsko razmnožavanje, proizvodnju bezvirusnih klonova, konzervaciju germplazme, razvoj novih kultivara, ali i proučavanje sekundarnih metabolita (Eady, 1995.).

### 1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi utjecaj različitog spektra svjetla i koncentracije hormona na početni porast eksplantata češnjaka *in vitro*.

## 2. Pregled literature

### 2.1. Mikrorazmnožavanje češnjaka

Češnjak je vrsta koja se razmnožava aseksualno, odnosno vegetativno, pomoću lukovica i češnjeva. Gotovi sve genotipovi češnjaka izgubili su sposobnost stvaranja sjemena. Postoje pojedine forme češnjaka koje mogu cvjetati u određenim uvjetima, ali su cvjetovi sterilni. Kod drugih dolazi do odumiranja cvjetnog pupoljka prije otvaranja ili uopće ne postoji sposobnost razvoja cvijeta (Etoh i sur., 2002.).

Aseksualan način razmnožavanja češnjaka za posljedicu ima nisku stopu multiplikacije, smanjenu varijabilnost te probleme s virusnim bolestima. Gotovo su svi komercijalni kultivari češnjaka zaraženi s nekim od virusa. Zbog aseksualne prirode češnjaka razvoj novih kultivara konvencionalnim oplemenjivanjem je otežan (Malik i sur., 2009.). Robledo-Paz i Tovar-Soto (2012.) navode da vegetativno razmnožavanje ima brojne nedostatke kao što su niska stopa multiplikacije (5 do 10 po godini), skupo i kratkoročno skladištenje koje zahtijeva veliki prostor, prijenos patogena iz generacije u generaciju i sa površine na površine te u konačnici smanjenje kvalitete i smanjenje prinosa čak i do 70%.

Važnu ulogu u rješavanju navedenih problema odigrala je biotehnologija, odnosno primjena biotehnoloških metoda i tehnika. Svakako jedne od najvažnijih jesu tehnike kulture tkiva i stanica ili tzv. *in vitro* tehnike.

Ideja da se organi, tkiva i stanice biljaka izdvoje i uzgajaju u kontroliranim laboratorijskim uvjetima datira još iz 19.st. kao rezultat teorije o totipotentnosti stanica Schwann (1847.). Prve praktične pokušaje dobivanja *in vitro* kultura izveo je Haberlandt (1902.). Dobivanje pravih kultura tkiva, odnosno kalusa, uslijedilo je 1939. kada su Gautheret (1939.) i Nobecourt (1939.) objavili uspješno dobivanje i kultiviranje kalusa mrkve. U radovima koji su uslijedili dokazano je da se kalus može i diferencirati, odnosno da je moguće regenerirati biljne organe. Precizni uvjeti pod kojima dolazi do diferenciranja organa formulirani su tek kasnije otkrićem citokinina – regulatora rasta koji stimuliraju diobu stanica. Prekretnica u radu s biljnim *in vitro* kulturama dogodila se kada su Skoog i Miller (1957.) utvrdili da se odnosom citokinina i auksina može regulirati organogeneza (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996.).

Postupak mikropropagacije razrađen je u prvoj polovini 70-ih godina prošloga stoljeća na voćnim vrstama, a posebno na jagodama i podlogama za razne vrste roda *Prunus*. Pojava

mikropropagacije bila je trijumf primjene metoda kulture *in vitro* u klonskom razmnožavanju biljaka. Mikropropagacija je omogućila izuzetno veliku brzinu razmnožavanja tokom cijele godine u laboratorijskim uvjetima, gdje je moguće osigurati apsolutnu kontrolu uvjeta rasta i zdravstvenog stanja kulture (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996.).

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

Primjena mikrorazmnožavanja u proizvodnji češnjaka započela je, kao što je ranije navedeno, 70-ih godina prošloga stoljeća. Mikrorazmnožavanje češnjaka može se odvijati na dva načina: 1) organogenezom – dolazi do formiranja organa (npr. korijen, stabljika) i 2) somatskom embriogenezom – dolazi do formiranja struktura nalik embriju. Oba procesa mogu i ne moraju uključivati fazu kalusa. Embriogeneza ima određene prednosti u odnosu na organogenezu kao što su veći „output“ biljaka, manji troškovi i manja zahtjevnost. Međutim, većina protokola za mikrorazmnožavanje češnjaka bazira se na organogenezi (Sata i sur., 2001., Robledo-Paz i Tovar-Soto, 2012.). Abo El-Niil (1977.) prvi je izvijestio o uspješnoj regeneraciji češnjaka putem organogeneze i embriogeneze.

Prema Jelaska (1994.) mikrorazmnožavanje uključuje sljedeće faze:

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

Faza I: Uvođenje u kulturu – Najvažnije cilj ove faze jest postići sterilan rast eksplantata. Uključuje površinsku sterilizaciju i izolaciju eksplantata.

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

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

Faza IV: Prijenos biljčica u zemlju – Prilagodba biljaka na rast u vanjskim uvjetima.

Keller i Senula (2013.) navode da mikrorazmnožavanje češnjaka ima posebne značajke zbog svoje lukovičaste prirode, gdje je meristemska regija sakrivena u unutrašnjem dijelu lukovice na njenom bazalnom dijelu. Također, navode da kasna zima i rano proljeće predstavljaju najbolje vrijeme za uzimanje eksplantata.

Najvažniji faktori koji utječu na regeneraciju biljke su tip eksplantata, fiziološko stanje eksplantata, genotip i primijenjena kombinacija regulatora rasta (Scotton i sur., 2013.).

U istraživanjima vezanim uz *in vitro* razmnožavanje češnjaka mogu se pronaći primjeri propagacije češnjaka iz različitih tipova eksplantata kao što su: vrh korijena (Shuto i sur., 1993., Haque i sur., 2000) vrh izdanaka (Nagakubo i sur., 1993., Verbeek i sur., 1995., Jang i sur., 2000.), bazalni dijelovi lukovice (Masuda i sur., 1994.) list (Wang i sur., 1994., Maggioni i sur., 1989.), stabljika (Tapia, 1996.) i dr.

Taskin i sur. (2013.) uspoređivali su tehnike kulture meristema i kulture vrhova izdanaka za razvoj bezvirusnih biljaka češnjaka. *In vitro* biljke dobivene iz kulture meristema i vrhova izdanaka testirane su na prisustvo OYDV i LYSV virusa pomoću PCR analize. Kod biljaka koje su uzgajane u kulturi meristema nije utvrđeno prisustvo navedenih virusa. Međutim, oba virusa pronađena su kod biljaka dobivenih iz kulture vrhova izdanaka, OYDV kod njih 73%, a LYSV kod njih 87%.

Roksana i sur. (2002.) navode da su uspješno dobivene *in vitro* lukovice iz vrhova izdanaka češnjaka kao eksplantata. Za razvoj lukovica korišteno je opetovano subkultiviranje (4x) biljčica na tekućem i polutekućem MS mediju sa 0,5 mg/L 2ip + 0,25 mg/L NAA. Tako regenerirane lukovice uspješno su prenešene u tlo.

Scotton i sur. (2013.) ispitivali su *in vitro* regeneraciju osam kultivara češnjaka korištenjem dijelova korijena kao eksplantata. Eksplantati su uvedeni u MS medij sa 2,4-D i 2-iP

hormonima. Kalusi su prenešeni na MS medij sa 8,8  $\mu\text{M}$  BAP i 0.1  $\mu\text{M}$  NAA (medij A) ili medij sa 4,6  $\mu\text{M}$  kinetina (medij B). Nakon šezdeset dana ocjenjena je frekvencija regeneracije. Utvrđeno je da je medij A inducirao najveću frekvenciju regeneracije kod svih kultivara.

Haque i sur. (2003.) navode da su korištenjem meristema izdanka i meristema korijena kao eksplantata uspješno regenerirani izdanci češnjaka i razvijena lukovica. Za kulturu je korišten MS medij sa različitim kombinacijama regulatora rasta. Regeneracija iz meristema izdanka bila je najveća u mediju bez regulatora rasta. Iz meristema korijena regenerirano je 40 % izdanaka na MS mediju sa 1,0  $\mu\text{M}$  NAA i 10,0  $\mu\text{M}$  BA. Lukovice su dobivene iz regeneriranih izdanaka češnjaka u svim ispitivanim medijima.

Kim i sur. (2003.) ispitivali su utjecaj tekućih medija na *in vitro* proliferaciju izdanaka češnjaka i razvoj lukovica. Eksplantati uzgajani u tekućem mediju imali su povećanu razinu multiplikacije i svježije mase izdanaka u odnosu na one uzgajane u polutekućem ili čvrstom mediju. MS medij sa 11% saharoze pokazao se optimalnim za razvoj lukovica. Najveća razina multiplikacije utvrđena je kod eksplantata kultiviranih na mediju sa 0,1 mg/L NAA + 11% saharoze i 10,0  $\mu\text{M}$  JA.

## 2.2. Utjecaj svjetlosti na *in vitro* rast

Najvažniji okolišni čimbenici koji utječu na *in vitro* rast su svjetlost, temperatura, vlažnost i dostupnost kisika. Razina svjetlosti izražava se kao fotosintetski aktivna radijacija, a označava broj fotona po kvadratnom metru po sekundi za spektar svjetlosti valne duljine 400 – 700 nm. Količina svjetlosti koja je potrebna biljkama u kulturi tkiva znatno je niža od one koju trebaju biljke uzgajane u poljskim uvjetima. Tako je fotosintetska aktivnost biljaka u kulturi ograničena smanjenim intenzitetom svjetlosti i brzim trošenjem  $\text{CO}_2$ . Općenito se u kulturi tkiva koristi razina svjetlosti od 60-70  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Glavne karakteristike svjetlosti koje imaju značajan utjecaj na *in vitro* rast biljaka su kvaliteta svjetlosti, intenzitet svjetlosti i fotoperiod (Reuveni i Evanor, 2007.)

Kvaliteta svjetlosti podrazumijeva određenu valnu duljinu ili boju, koja dolazi do površine biljke. Fotosintetska reakcija biljaka pod utjecajem je valnih duljina ultraljubičaste (300-380 nm), plave (430-490 nm), crvene (640-700) i daleko-crvene (700-760 nm) svjetlosti (Kozai i sur., 1992.). Biljke apsorbiraju plavu i crvenu svjetlost koje imaju najveći utjecaj na njihov

rast i razvoj. Crvena svjetlost tako utječe na fotosintezu, klijanje zrna, rast presadnica i cvjetanje i razvoj plodova, dok plava svjetlost utječe na fotosintezu i vegetativni rast listova. Intenzitet plave svjetlosti utječe na stimulaciju i inhibiciju rasta kalusa. Crvena svjetlost generalno potiče formiranje adventivnih izdanaka kod većine biljaka. Crvena svjetlost je važna za razvoj fotosintetskog aparata, dok je plava svjetlost važna za formiranje klorofila, razvoj kloroplasta, otvaranje puči, sintezu enzima i fotomorfogenezu (Goh, 2009., Kang i sur., 2008.). Različite biljne vrste pokazale su bolji odgovor na crvenu nego na plavu svjetlost, iako postoje i one koje reagiraju slično na obje svjetlosti, a što opet ovisi o izvedbi samoga istraživanja (Jain i Ishii, 2003.).

Reakcija biljke na svjetlost ovisi o biljnoj vrsti, tipu i stupnju razvijenosti eksplantata.

Kontrola kvalitete svjetlosti odnosno spektra svjetlosti može se koristiti u kulturi tkiva za reguliranje rasta i razvoja, poboljšanje kvalitete i povećanja prinosa biljke (Economou i Read, 1987.) Također, istraživanja su pokazala da kvaliteta svjetlosti može utjecati na biološku efikasnost regulatora rasta prisutnih u mediju kao i na endogenu hormonalnu ravnotežu nekoga tkiva (Jain i Ishii, 2003.).

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

Jain i Ishii (2003.) navode da je crvena svjetlost pokazala mogućnost utjecaja na proliferaciju izdanaka te da fitokrom kao aktivni fotoreceptor osjetljiv na crvenu/daleko crvenu svjetlost u svom aktivnom obliku utječe na promjene u endogenoj hormonalnoj ravnoteži u korist reduciranja apikalne dominacije i povećanja razvoja bočnih izdanaka. Također, navode da postoji značajna interakcija između koncentracije citokinina i kvalitete svjetlosti te da određene valne duljine mogu oponašati ili djelomično zamijeniti ovisnost o citokininu.

Duljina fotoperioda u kulturi tkiva također ovisi o tipu eksplantata. Većina eksplantata dobro raste pri osvjetljenju u trajanju od 14-16 sati.

Tip lampe koji se koristi kao izvor svjetlosti regulira rast i razvoj kulture. Hladne, fluorescentne lampe, koje emitiraju bijelu svjetlost, pronašle su široku primjenu u komercijalnim laboratorijima budući da spektar svjetlosti koji emitiraju simulira sunčevo zračenje te uz to emitiraju ograničenu količinu topline, a koja bi mogla dovesti do nepoželjnog povećanja temperature u klima komori. Fluorescentne lampe koriste za povećanje fotosintetskog toka fotona u *in vitro* kulturi, međutim, Gupta i Jatothu (2013.) navode da fluorescentne lampe emitiraju i nepotrebne valne duljine, koje su niske kvalitete za promicanje rasta i morfogeneze. Pored fluorescentnih dostupan je široki izbor različitih tipova lampi kao što su visokotlačne i niskotlačne natrijeve lampe, metalhalogene lampe, živine lampe, lampe sa žarnom niti i dr. Također, upotrebom posebnih filtera moguće je regulirati koji dio spektra će lampa emitirati (Jain i Ishii, 2003.). U novije vrijeme sve više se koriste LED lampe, koje su prvi puta opisane 1991. (Bula i sur., 1991.). Prednosti LED lampi očituju se u mogućnosti kontrole spektralnog sastava, maloj masi i volumenu lampi, izdržljivosti, dugom vijeku trajanja, specifičnosti valne duljine, relativno hladnoj površini uz minimalno zagrijavanje, „outputu“ fotona linearnom sa „inputom“ električne struje i u konačnici optimalnijoj proizvodnji i utjecaju na biljnu morfologiju i metabolizam (Bourget, 2008., Morrow, 2008.). Međutim, zbog male veličine LED lampi potreban je njihov veliki broj kako bi se osvijetlila površina klima komore.

Pri odabiru lampi treba obratiti pozornost na: I) odabir najbolje kombinacije svjetlosnog spektra s obzirom na fazu *in vitro* kulture, II) odabir intenziteta svjetlosti i fotoperioda koji će dovesti do maksimalnog biološkog odgovora uz najmanje troškove energije, III) količinu topline koju emitiraju lampe, a koja bi trebala biti minimalna kako ne bi došlo do promjene temperature unutar klima komore (Jain i Ishii, 2003.).

Charoensub i Kritsanamara (2011.) navode da iako LED lampe omogućavaju specificiranje valne duljine i smanjuju trošak energije, s druge strane zahtijevaju posebnu instalaciju, pa tako fluorescentne lampe i dalje predstavljaju često korišteni izvor svjetlosti kod komercijalne mikropropagacije. Uspoređivanjem T5 i T8 fluorescentnih lampi utvrdili su da je T5 lampa smanjila trošak električne energije za 75%, ali je istovremeno imala niži intenzitet u odnosu na T8 lampu.

Lin i sur. (2013.) navode da su ranija istraživanja pokazala da je kombinacija crvenog i plavog LED svjetla vrlo efektivna za biljni rast i razvoj. Spomenuti autori ispitali su utjecaj crvenog, plavog i bijelog LED svjetla na rast, razvoj i kvalitetu salate. Istraživanjem je

utvrđeno da su masa korijena i izdanka, kao i svježina i slatkoća salate bili veći kod biljaka izloženih kombinaciji crvenog, plavog i bijelog svjetla u odnosu na biljke koje su bile izložene fluorescentnim lampama.

Hoffman i sur. (2016.) ispitivali su utjecaj svjetlosnog režima na razvoj adventivnog korijenja topole. Utvrđeno je da su mikroreznice topole izložene utjecaju fluorescentnih lampi bile značajno bolje razvijene u odnosu na one koje su bile izložene utjecaju LED lampi.

Fraszczak (2013.) je ispitivao utjecaj kratkoročnog izlaganja crvenoj i plavoj svjetlosti na rast kopra. Rezultati su pokazali da su biljke izložene plavoj svjetlosti slabije rasle te su imale manju masu i površinu u odnosu na biljke koje su bile izložene crvenoj svjetlosti.

Bello-Bello i sur. (2016.) ispitivali su utjecaj fluorescentnih i LED lampi (bijela, plava, crvena i plava + crvena svjetlost) na *in vitro* proliferaciju i rast izdanaka vanilije. Rezultati su pokazali da se bijela i plava + crvena svjetlost mogu koristiti za proliferaciju izdanaka, dok se bijela svjetlost može koristiti za *in vitro* rast.

Chee i Pool (1989.) navode da je kod vinove loze bijela svjetlost dovela do povećanja veličine izdanka i povećanja stope proliferacije za 50% u odnosu na crvenu svjetlost.

Kim i sur. (2003.) ispitivali su utjecaj svjetlosti i temperature na proliferaciju izdanaka češnjaka. Biljke su uzgajane uz različite intenzitete svjetlosti (10, 50, 150 i 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) i različite temperature (15, 20, 25 i 30°C). Utvrđeno je da je intenzitet svjetlosti utjecao na proliferaciju izdanaka i biomasu izdanaka. Najveći broj izdanaka, kao i najveća biomasa, utvrđeni su pri intenzitetu svjetlosti od 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Intenzitet svjetlosti veći od 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nije pokazao stimulirajuće djelovanje. Optimalna temperatura bila je 25°C.

Martin-Urdiroz i sur. (2004.) ispitivali su utjecaj svjetlosti na organogenezu korijena češnjaka. Jedan dio uzoraka uzgajan je uz fotoperiod 16/8 i fluorescentne lampe intenziteta svjetlosti 55  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a drugi dio uzoraka inkubiran je u mraku. Utvrđeno je da svjetlost nije utjecala na formiranje kalusa, ali je značajno utjecala na povećanje regenerativne sposobnosti eksplantata.

Takagi i Qu (1995.) ispitivali su utjecaj kvalitete svjetlosti i fotoperioda na *in vitro* rast češnjaka. Navode da je *in vitro* razvoj lukovica bio potaknut produženim fotoperiodom, kao i to da je *in vitro* rast i razvoj lukovica bio potaknut svjetlosnim izvorima koji su emitirali daleko-crvenu svjetlost.

### 2.3. Utjecaj hormona na *in vitro* rast

Radi upravljanja organogenezom u *in vitro* kulturi u hranidbenu podlogu dodaju se mnoge tvari, koje djeluju na rast i razvitak biljnog organizma, među kojima važno mjesto zauzimaju biljni hormoni. Pokazalo se da mnoge biljne vrste i eksplantati očekivano odgovaraju na pogodan odnos između auksina i citokinina stvaranjem izdanaka i korijenja, ali i da u mnogim primjerima samo određena permisivna ravnoteža hormona dovodi do indukcije organogenog tkiva (Jelaska, 1994.). Tako Eady (1995.) navodi da većina kultivara češnjaka jednako reagira na medij i u njemu prisutne regulatore rasta te da u mediju sa povećanim sadržajem auksina dolazi do formiranja kalusa, dok u mediju sa povećanim sadržajem citokinina dolazi do razvoja izdanka.

Regulatori rasta predstavljaju bitnu komponentu hranjive podloge budući da utječu na smjer razvoja biljnih stanica te igraju ključnu ulogu u razvoju specifičnog modaliteta u kultiviranim stanicama i tkivima, a uslijed akumulacije specifičnih biokemijskih sadržaja u njima (Ul-Haq i sur., 2007.).

Biljni hormoni su tvari koje primijenjene u relativno niskoj koncentraciji kontroliraju i usmjeravaju rast biljke. Obično se dijele u četiri skupine: auksini, citokinini, giberelini i inhibitori (etilen i ABA). Biljni hormoni kontroliraju ne samo brzinu rasta jednog organa ili tkiva, već svojim balansiranjem mogu izazvati diferenciranje organa, odnosno usmjeravaju i usklađuju rast kompleksnih struktura (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996.).

Citokinini i auksini su najvažniji biljni hormoni za *in vitro* kulturu. U medije rasta se obično stavljaju u kombinaciji budući da se upravo manipulacijom i varijacijom citokinina i auksina najuspješnije mijenja rast i ponašanje biljne kulture (Dixon i Gonzales, 1994.). Auksini su organske tvari čije je fiziološko djelovanje produžni rast stanica, regulacija reakcija na osvjetljenje (fototropizam) i gravitaciju (gravitropizam), apikalna dominacija (produžni rast vršnog meristema), odgađanje otpadanja listova i plodova u ranijim fazama razvoja, razvoj bočnog i adventivnog korijenja, razvoj plodova i indukcija partenokarpije. Osim prirodnih auksina, sintetske tvari slične kemijske strukture i djelovanja se koriste komercijalno za poboljšanje zakorjenjivanja reznica, izazivanje partenokarpije, ubrzavanje zriobe plodova, sprječavanje odbacivanja plodova (abscisija) te u nekim herbicidima. Citokinini su hormoni čija se funkcija ogleda u regulaciji stanične diobe, diferenciranju stanica i formiranju organa, kontroli morfogeneze u kulturi tkiva, mobilizaciji hranjivih tvari, regulaciji prometa tvari organa koji više ne rastu i odgađanju senescencije, povećanju rasta bočnih pupova, regulaciji

metaboličkih procesa, utjecaju na rast vrha korijena, povećavanju otpornosti biljaka na visoke i niske temperature, na gljivična oboljenja i intenziviranju transpiracije (Teklić, 2012.).

Hormoni imaju ključnu ulogu u mikrorazmnožavanju budući da se odabirom koncentracije i vrste hormona može odrediti tijek razvoja biljne kulture. Tako se povećanjem koncentracije citokinina potiče razvoj nadzemne mase, a time i mogućnost umnožavanja, dok se većom koncentracijom auksina potiče rast korijena (Parađiković, 2015.).

Auksini koji se najčešće dodaju u hranjivu podlogu su: 3-indolactena kiselina (IAA), 3-indolmaslačna kiselina (IBA), 1-naftalenoctena kiselina (NAA), 4-klorfenoksiactena kiselina (CPA) i 2,4-diklorofenoksiactena kiselina (2, 4 – D) (Jelaska, 1994.). Auksini stimuliraju izduživanje koleoptile i izdanaka, stimuliraju rizogenezu tj. formiranje adventivnog korijenja, kao i bočno grananje korijenja. Auksini su također nužni za induciranje i održavanje kalusa. Prirodni auksin IAA (indol-3-octena kiselina) otkriven je 1927. godine. Pored IAA, za kulture *in vitro* koriste se i IBA, NAA i 2,4-D, pri čemu je redoslijed obrnut jačini djelovanja. Kod postupka mikropropagacije auksini se najviše koriste kao faktori rizogeneze za induciranje adventivnog korijenja (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996.).

Citokinini koji se najčešće dodaju u hranjivu podlogu su: N<sub>6</sub>-benzilaminopurin (BA), N<sub>6</sub>- $\gamma$ , $\gamma$ -dimetilalilaminopurin (2iP), N<sub>6</sub>-furfurilaminopurin ili kinetin (KIN) (Jelaska, 1994.). Citokinini su biljni hormoni koji reguliraju diobu stanice, a dijele se na prirodne i sintetske. Prvi citokinin koji je bio otkriven je kinetin. Prirodni citokinin koji se nalazi u biljkama je zeatin. Za mikropropagaciju najvažniji efekt citokinina jest poništavanje apikalne dominacije i izduživanje aksilarnih pupoljaka. Poticanjem pojave i izduživanja bočnih izboja citokinini direktno utječu na multiplikaciju biljnog materijala. Citokinini su i antagonisti auksinima u rizogenezi jer sprječavaju formiranje i rast adventivnog korijenja. Za *in vitro* kulturu značajni su BAP (6-benzil aminopurin), iP (izopentil adenin) i TDZ (tidiazuron). U postupku mikrorazmnožavanja najviše se koristi BAP i to u koncentraciji 0,1-2,0 mg/L (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996., Tkalec i sur., 2014.).

Utami i sur. (2013.) ispitivali su optimalnu kombinaciju IAA i BAP hormona u MS mediju za *in vitro* organogenezu vrste *Allium ascalonicum*. Istraživanjem je utvrđeno da se kombinacija 0,01 ppm IAA i 1,0 ppm BAP pokazala najboljom za indukciju organogeneze *A. ascalonicum* u MS mediju.

Tkalec i sur. (2014.) ispitivali su utjecaj različitih koncentracija dva tipa citokinina (6-benzilaminopurina i kinetina) na multiplikaciju *Pelargonium zonale* u kulturi tkiva. Utvrđeno je da su koncentracije biljnog hormona BAP značajno utjecale na indeks multiplikacije te su ostvarene veće vrijednosti pri nižoj koncentraciji. Suprotno tome, veća koncentracija hormona kinetina rezultirala je i najvećim indeksom multiplikacije.

Patena i sur. (1991.) su za *in vitro* indukciju bočnih izdanaka vrsta *A. sativum* i *A. ascalonicum* koristili kombinaciju 0,5 mg/L NAA sa 1,0-2,0 mg/L 2iP za vrstu *A. sativum* i 2,0 mg/L BAP za vrstu *A. ascalonicum*. Kombinacija NAA-Ki nije se pokazala efektivnom kod *A. sativum*, dok je kod *A. ascalonicum* bila manje efektivna u odnosu na NAA-BAP kombinaciju.

Luciani i sur. (2006.) ispitivali su utjecaj različite vrste eksplantata i regulatora rasta na razvoj kalusa češnjaka i regeneraciju biljke. Primjenom 0,045  $\mu$ M 2,4-D i BAP regeneracija kalusa iz bazalnih dijelova češnjaka iznosila je 41%, dok je primjenom 0,45  $\mu$ M 2,4-D regeneracija iz meristema, vršaka korijena i nezrelih cvati iznosila redom 57%, 56% i 20%.

Mehta i sur. (2013.b) su za *in vitro* propagaciju češnjaka koristili nodalne eksplantate stabljike. Indukcija izdanaka iz nodalnih segmenata bila je najveća u MS mediju sa 1,0 mg/L Kn. Za razvoj korijena korištene su različite koncentracije IBA gdje je kao optimalna koncentracija utvrđena vrijednost 2,0 mg/L IBA. Eksplantati peteljke lista korišteni su za indukciju kalusa. Najbolji rast zabilježen je u MS mediju sa 0,25 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kn i 0,25 mg/L 2,4 -D + 0,5 mg/L BAP.

Gull i sur. (2014.) ispitivali su utjecaj različitih fitohormona na mikropropagaciju češnjaka. Kao eksplantat korišten je meristem izdanka. Među različitim koncentracijama i kombinacijama fitohormona, 1,5 mg/L kinetina utvrđen je kao optimalan za razvoj izdanaka (93%) i razvoj korijena (70%). Pri optimalnim koncentracijama biljčice češnjaka sa maksimalnom visinom od 15,4 cm i 5,7 korijenova po biljci dobivene su nakon 15 dana.

Mahajan i sur. (2013.) ispitivali su utjecaj različitih kombinacija regulatora rasta u MS mediju na proliferaciju i multiplikaciju izdanaka češnjaka. Maksimalan broj izdanaka dobiven je u MS mediju sa 1,0 mg/L kinetina (5,0 +/- 0,55 izdanaka po eksplantatu). Efektivan razvoj korijenja dobiven je u MS mediju sa 0,1 mg/L NAA.

Dixit i sur. (2013.) ispitivali su utjecaj različite koncentracije i kombinacije hormona na indukciju kalusa češnjaka. Medij (B-5 Gamborg) sa 13,60  $\mu$ M ili 22,66  $\mu$ M 2,4-D pokazao

se optimalnim za indukciju kalusa. Za poboljšanje regeneracije izdanaka i lukovica korišten je tzv. regeneracijski medij, B-5 medij sa 2,45  $\mu$ M 2iP i 0,537  $\mu$ M NAA.

Haque i sur. (2003.) ispitivali su utjecaj hormona 2,4-D i BAP na *in vitro* regeneraciju češnjaka. Kao eksplantati su korišteni vrhovi korijena, bazalni diskovi i listovi. Ispitivan je utjecaj različitih kombinacija i koncentracije hormona na indukciju kalusa, proliferaciju, organogenezu i regeneraciju biljčica. Najveći rast kalusa zabilježen je pri 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BAP u MS mediju. Najveća proliferacija zabilježena je u MS mediju sa 2,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BAP, a najveći broj regeneriranih biljčica kod MS + 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BAP. Biljčice su uspješno prenesene u tlo. Postotak preživljavanja bio je 40-60%

Mehta i sur. (2013.a) navode da su iz kalusa češnjaka uspješno regenerirani somatski embriji. Veličina embrija bila je maksimalna u MS mediju sa 0,5 mg/L Kn + 0,25 mg/L 2,4 -D. Indukcija izdanaka iz embrija bila je najveća u MS mediju sa 1 mg/L Kn. Za razvoj korijena korištene su različite koncentracije IBA te je najveći razvoj zabilježen kod koncentracije 1,0 mg/L IBA.

### 3. Materijal i metode

Istraživanje je provedeno akademske 2014./2015. godine u Laboratoriju za povrćarstvo, cvjećarstvo, ljekovito, začinsko i aromatično bilje, Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku.

#### 3.1. Biljni materijal

U istraživanje su bila uključena dva autohtona ekotipa češnjaka – Slavonski ozimi (Hrvatska) i Vincek (Slovenija, Semenarna Ljubljana). Održivač Slavanskog ozimog češnjaka je Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

##### 3.1.1. Morfološki opis Slavanskog ozimog češnjaka

Slavonski ozimi češnjak je jednogodišnja, zeljasta biljka visine 40-50 cm. Korijen je žiličast, a na bazi češnjaka se razvije razmjerno debelo, slabo razgranato, adventivno korijenje koje se prostire u površinskom sloju tla. Korjenov sustav je slabije usvojne moći. Klicu čine 2-3 zametnuta lista koji izbiju na gornji otvor češnja. Listovi su izduženi, plosnati, kožasti i pri vrhu zašiljeni te su uspravnog do polu-uspravnog položaja u odnosu na lažnu stabljiku. Prvi list je bez plopke, a sjedeći su građeni od lisnog rukavca i linearne plopke. Lisne plopke duge su 25-30 cm, a široke su oko 2 cm. Listovi su zelene boje s izraženom voštanom prevlakom koja im daje prividno sivu boju. Lisni rukavci formiraju lažnu stabljiku dugu oko 20 cm. Tijekom rasta biljke razvije se 10-12 listova. Pri završetku rasta listova u pazušcu najmlađeg lista zametne se jedan pup koji će formirati cvjetnu stabljiku. Najstariji listovi nemaju pupova, a od njihovih rukavaca nastaju 2-4 vanjska ovojna lista lukovice. Premještanjem asimilata iz lišća pupovi rastu i formiraju se češnjevi. Lukovica češnjaka je građena od 12-16 češnjeva koji su cirkularno smješteni u lukovici te su srednje veličine. Svaki češanj se sastoji od vanjske čvrste ovojnice bijele boje s mogućom pojavom obojenja antocijaninom te parenhimskog tkiva i klice. Češnjevi su vrlo stiješnjeni te je cijela lukovica vrlo čvrsta i kompaktna. U nepovoljnim agroekološkim uvjetima te u slučaju bogate gnojidbe pojavljuje se cvjetna stabljika dok u normalnim agroekološkim uvjetima i dostatne gnojidbe ne dolazi do pojave cvjetnog stabalca. Cvjetna stabljika je visine od 70 – 80 cm. Na vrhu nosi zračne češnjiće i nekoliko sterilnih cvjetova, koji su u početku obavijeni jednim ovojnim listom. Iz zračnih češnjića se mogu razviti nove biljke sa sitnijom lukovicom koja ima jedan ili više sitnih češnjeva. Ove zračne lukovice se otkidaju čim se jave kako bi se povećao prinos. Vađenje nastupa nakon što se nadzemni dio počne sušiti tijekom početka do polovine mjeseca srpnja. U uvjetima jednostavnoga skladištenja bez dodatnog hlađenja, češnjevi se ne osuše i ne prokljavaju unutar lukovice sve do svibnja iduće godine te ova sorta spada u

skupinu češnjaka kasnog prekida dormantnosti. Ovo svojstvo je također vrlo poželjno jer omogućuje dužu distribuciju lukovica na tržištu (Parađiković i sur., 2015.).

### 3.1.2. Morfološki opis češnjaka Vincek

Češnjak Vincek je slovenski autohtoni ozimi ekotip češnjaka koji se obično sadi krajem listopada. Zametnuti listovi odnosno klica izbija nakon dva mjeseca. List češnjaka je širok i tamno zelene boje. Razvoj češnjaka u proljeće je nešto sporiji. Češnjak razvija cvjetnu granu. Češnjevi su veliki i raspoređeni oko cvjetnog stabla, a ima ih osam do deset u lukovici. Glavica češnjaka zavijena je u bijele suhe ljuske. Češnjevi češnjaka imaju ljuske smeđe boje. Češnjak ima jak miris i dobro se skladišti.

### 3.2. Priprema hranjive podloge

Hranjiva podloga pripremljena je prema recepturi Linsmaier i Skoog (1965.). Za istraživanje su korištene dvije različite varijante hranjive podloge koje su se razlikovale u koncentraciji hormona 6-benzil aminopurina (BAP) iz grupe citokinina. Jedna varijanta hranjive podloge sadržavala je 1,0 mg/L BAP, a druga 1,5 mg/L BAP.

Hranjiva podloga pripremljena je na sljedeći način:

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

Tablica 1. Sastojci i količine sastojaka za pripremu hranjive podloge

| <i>Sastojak</i>      | <i>Količina (za 0,5 l podloge)</i> |        |
|----------------------|------------------------------------|--------|
| <i>Agar</i>          | 3,2 g                              |        |
| <i>Inositol</i>      | 0,05 g                             |        |
| <i>Saharoza</i>      | 15 g                               |        |
| <i>Makroelementi</i> | 50 ml                              |        |
| <i>Mikroelementi</i> | 0,5 ml                             |        |
| <i>Vitamini</i>      | 0,5 ml                             |        |
| <i>Željezo (Fe)</i>  | 2,5 ml                             |        |
| <i>IBA</i>           | 50 µl                              |        |
| <i>BAP</i>           | 500 µl                             | 750 µl |



Slika 1. Priprema hranjive podloge (foto original; S. Guberac)



Slika 2. Epruvete s hranjivom podlogom (foto original, S. Guberac)

### 3.3. Izdvajanje i sterilizacija eksplantata

Za izdvajanje eksplantata prikupljeni su vizualno zdravi češnjevi češnjaka koji su prethodno očišćeni. Češnjevi su ispirani pod mlazom vode pet minuta. Nakon toga češnjevi su stavljeni jednu minutu u 70% alkohol, a zatim 20 minuta u 20% varikinu kojoj je dodano nekoliko kapi deterdženta. Nakon toga češnjevi su ispirani autoklaviranom destiliranom vodom pet puta (Slika 3.).



Slika 3. Sterilizacija češnjeva (foto original, S. Guberac)

Pribor koji se koristio za fizičko izdvajanje eksplantata prethodno je prokuhan i očišćen sa 96% alkoholom. Izdvajanje je obavljeno u laminaru u sterilnim uvjetima. Kao eksplantati korišteni su dijelovi klice češnjeva češnjaka. Izdvajanje klica je obavljeno pomoću laboratorijskog nožića i pincete u Petrijevim zdjelicama. Laboratorijski nožić i pinceta su za vrijeme izdvajanja sterilizirani ispiranjem u alkoholu i paljenjem na plameniku. Izdvojene klice su sterilizirane 10 minuta u varikini kojoj je dodano nekoliko kapi deterdženta (Slika 4.).



Slika 4. Izdvajanje eksplantata (foto original; S. Guberac)

#### 3.4. Uvođenje u kulturu

Od ekotipa Vincek izdvojeno je 136 eksplantata. Od ukupnog broja eksplantata njih 68 uvedeno je u hranjivu podlogu koja je sadržavala 1,0 mg/L BAP te su uzorci stavljeni u klima komoru na način da je polovica eksplantata stavljena pod plavo svjetlo, a polovica pod bijelo svjetlo u tri ponavljanja. Preostalih 68 eksplantata uvedeno je u hranjivu podlogu koja je sadržavala 1,5 mg/L BAP te je također jedna polovica eksplantata stavljena pod plavo, a druga pod bijelo svjetlo. Temperatura u klima komori održavana je na  $\sim 23^{\circ}\text{C}$ .

Od ekotipa Slavenskog ozimog češnjaka izdvojeno je 60 eksplantata. Od toga je 30 eksplantata uvedeno u hranjivu podlogu koja je sadržavala 1,0 mg/L BAP te su uzorci stavljeni u klima komoru tako da se polovica eksplantata nalazila pod plavim svjetlom, a polovica pod bijelim svjetlom. Preostalih 30 eksplantata uvedeno je u hranjivu podlogu koja je sadržavala 1,5 mg/L BAP te je također jedna polovica eksplantata stavljena pod plavo, a druga pod bijelo svjetlo. Svi tretmani bili su zastupljeni sa po 15 biljka u tri ponavljanja. Temperatura u klima komori održavana je na ~23°C.

Uvođenje eksplantata u kulturu provedeno je u sterilnim uvjetima i korištenjem sterilnog laboratorijskog pribora. Eksplantati su uvedeni u kulturu na način da je korištenjem pincete svaka pojedina klica bila uronjena svojim baznim dijelom u hranjivu podlogu unutar epruvete. Nakon toga svaka epruveta zatvorena je čepom kako ne bi došlo do kontaminacije materijala (Slika 5.).



Slika 5. Eksplantati pod bijelim i plavim svjetlom (foto original; S. Guberac)

### 3.5. Mjerenje i umnažanje materijala

Nakon dva tjedna uzorci su izvađeni iz klima komore te se pristupilo mjerenju duljine i mase biljaka te umnažanju biljnog materijala. Zagađeni i bolesni uzorci su uklonjeni. Duljina biljke izmjerena je korištenjem sterilne pincete i papira s mjernom skalom, a masa biljke je određena korištenjem laboratorijske vage (Slika 6. i 7.). Osim mase i duljine biljaka zabilježen je i multiplikacijski indeks, odnosno broj novih eksplantata izdvojenih za slijedeću subkultivaciju.

Umnažanje je obavljeno u sterilnim uvjetima sa sterilnim laboratorijskim priborom. Eksplantati su uz pomoć pincete i nožića podjeljeni na manje dijelove koji su zatim sterilizirani na jednak način kao i početni materijal te ponovno uvedeni u kulturu (Slika 8.).



Slika 6. Mjerenje mase biljaka (foto original; S. Guberac)



Slika 7. Mjerenje duljine biljaka (foto original; S. Guberac)



Slika 8. Umnažanje materijala (foto original; S. Guberac)

### 3.6. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program Poljoprivredna statistika VVStat (Vukadinović, 2013.). Razlike između tretmana ispitane su dvofaktorijalnom analizom varijance ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ). Post hoc analiza je provedena pomoću LSD testa, pri čemu su razlike između razine pojedinačnih tretmana utvrđene pri razini značajnosti 95% ( $p < 0,05$ ) i 99% ( $p < 0,01$ ).

#### 4. Rezultati i rasprava

Statističkom obradom podataka dobiveni su sljedeći rezultati:

Najveća prosječna duljina češnjaka Vincek (103,44 mm), utvrđena je kod tretmana plavim svjetlom uz koncentraciju hormona 1,5 mg/L BAP, a najmanja duljina (64,55 mm) kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 1,0 mg/L BAP. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) koncentracije hormona i interakcije svjetlost x hormon na duljinu češnjaka Vincek. Analizom nije utvrđen statistički značajan utjecaj spektra svjetlosti na duljinu češnjaka (Tablica 2).

Tablica 2. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na duljinu češnjaka Vincek

| <b>Varijanta tretiranja A/B</b> | <b>1,0 mg/L (B1)</b> | <b>1,5 mg/L (B2)</b>     | <b>Prosjek</b>           |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Bijelo svjetlo (A1)</b>      | 81,663               | 86,417                   | 84,040                   |
| <b>Plavo svjetlo (A2)</b>       | 64,550               | 103,440                  | 83,995                   |
| <b>Prosjek</b>                  | 73,107               | 94,928                   | 84,017                   |
|                                 |                      |                          |                          |
| <b>LSD</b>                      | <b>Svjetlo (A)</b>   | <b>Konc. hormona (B)</b> | <b>Interakcije A x B</b> |
| <b>0,01</b>                     | Ns                   | 4,5218                   | 6,2670                   |
| <b>0,05</b>                     | ns                   | 2,7265                   | 3,4735                   |

Najveća prosječna masa češnjaka Vincek (1,096 g) utvrđena je kod tretmana plavim svjetlom uz koncentraciju hormona 1,5 mg/L BAP, a najmanja masa (0,622 g) kod tretmana plavim svjetlom uz koncentraciju hormona 1,0 mg/L BAP. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) spektra svjetlosti, koncentracije hormona i interakcije svjetlost x hormon na masu češnjaka Vincek (Tablica 3).

Tablica 3. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na masu češnjaka Vincek

| <b>Varijanta tretiranja A/B</b> | <b>1,0 mg/L (B1)</b> | <b>1,5 mg/L (B2)</b>     | <b>Prosjek</b>           |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Bijelo svjetlo (A1)</b>      | 0,738                | 0,660                    | 0,699                    |
| <b>Plavo svjetlo (A2)</b>       | 0,622                | 1,096                    | 0,859                    |
| <b>Prosjek</b>                  | 0,680                | 0,878                    | 0,779                    |
|                                 |                      |                          |                          |
| <b>LSD</b>                      | <b>Svjetlo (A)</b>   | <b>Konc. hormona (B)</b> | <b>Interakcije A x B</b> |
| <b>0,01</b>                     | 0,0439               | 0,0951                   | 0,0998                   |
| <b>0,05</b>                     | 0,0191               | 0,0574                   | 0,0594                   |

Prosječni indeks multiplikacije češnjaka Vincek iznosio je 3,471. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) koncentracije hormona i interakcije svjetlost x hormon na indeks multiplikacije češnjaka Vincek. Analizom nije utvrđen statistički značajan utjecaj svjetlosti na indeks multiplikacije (Tablica 4)

Tablica 4. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na multiplikacijski indeks češnjaka Vincek

| <b>Varijanta tretiranja A/B</b> | <b>1,0 mg/L (B1)</b> | <b>1,5 mg/L (B2)</b>     | <b>Prosjek</b>           |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Bijelo svjetlo (A1)</b>      | 3,889                | 3,167                    | 3,528                    |
| <b>Plavo svjetlo (A2)</b>       | 3,221                | 3,611                    | 3,416                    |
| <b>Prosjek</b>                  | 3,555                | 3,389                    | 3,471                    |
|                                 |                      |                          |                          |
| <b>LSD</b>                      | <b>Svjetlo (A)</b>   | <b>Konc. hormona (B)</b> | <b>Interakcije A x B</b> |
| <b>0,01</b>                     | Ns                   | 0,1424                   | 1,5171                   |
| <b>0,05</b>                     | ns                   | 0,0859                   | 0,6668                   |

Najveća prosječna duljina Slavanskog ozimog češnjaka (161,167 mm) utvrđena je kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 1,5 mg/L BAP, a najmanja duljina (112,889 mm) kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 1,0 mg/L BAP. Analizom varijance utvrđen je statistički značaj utjecaj ( $p < 0,01$ ) spektra svjetlosti, koncentracije hormona i interakcije svjetlost x hormona na duljinu Slavanskog ozimog češnjaka (Tablica 5).

Tablica 5. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na duljinu Slavanskog ozimog češnjaka

| <b>Varijanta tretiranja A/B</b> | <b>1,0 mg/L (B1)</b> | <b>1,5 mg/L (B2)</b>     | <b>Prosjeck</b>          |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Bijelo svjetlo (A1)</b>      | 112,889              | 161,167                  | 137,028                  |
| <b>Plavo svjetlo (A2)</b>       | 141,000              | 150,333                  | 145,667                  |
| <b>Prosjeck</b>                 | 126,944              | 155,750                  | 141,347                  |
|                                 |                      |                          |                          |
| <b>LSD</b>                      | <b>Svjetlo (A)</b>   | <b>Konc. hormona (B)</b> | <b>Interakcije A x B</b> |
| <b>0,01</b>                     | 9,1728               | 3,9349                   | 8,2669                   |
| <b>0,05</b>                     | 3,9769               | 2,3726                   | 4,2037                   |

Najveća prosječna masa Slavanskog ozimog češnjaka (0,959 g) utvrđena je kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 1,5 mg/L BAP, a najmanja masa (0,533 g) kod tretmana bijelim svjetlom uz koncentraciju hormona 1,0 mg/L BAP. Analizom varijance utvrđen je statistički značaj utjecaj ( $p < 0,01$ ) spektra svjetlosti, koncentracije hormona i interakcije svjetlost x hormona na masu Slavanskog ozimog češnjaka (Tablica 6).

Prosječni indeks multiplikacije Slavanskog ozimog češnjaka iznosio je 1,946. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) koncentracije hormona i interakcije svjetlost x hormon na indeks multiplikacije Slavanskog ozimog češnjaka. Analizom nije utvrđen statistički značajan utjecaj svjetlosti na indeks multiplikacije (Tablica 7).

Tablica 6. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na masu Slavenskog ozimog češnjaka

| <b>Varijanta tretiranja A/B</b> | <b>1,0 mg/L (B1)</b> | <b>1,5 mg/L (B2)</b>     | <b>Prosjek</b>           |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Bijelo svjetlo (A1)</b>      | 0,533                | 0,959                    | 0,746                    |
| <b>Plavo svjetlo (A2)</b>       | 0,817                | 0,916                    | 0,866                    |
| <b>Prosjek</b>                  | 0,675                | 0,938                    | 0,806                    |
|                                 |                      |                          |                          |
| <b>LSD</b>                      | <b>Svjetlo (A)</b>   | <b>Konc. hormona (B)</b> | <b>Interakcije A x B</b> |
| <b>0,01</b>                     | 0,1304               | 0,0850                   | 0,1287                   |
| <b>0,05</b>                     | 0,0565               | 0,0513                   | 0,0699                   |

Tablica 7. Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na multiplikacijski indeks Slavenskog ozimog češnjaka

| <b>Varijanta tretiranja A/B</b> | <b>1,0 mg/L (B1)</b> | <b>1,5 mg/L (B2)</b>     | <b>Prosjek</b>           |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Bijelo svjetlo (A1)</b>      | 1,666                | 2,000                    | 1,833                    |
| <b>Plavo svjetlo (A2)</b>       | 2,083                | 2,037                    | 2,060                    |
| <b>Prosjek</b>                  | 1,875                | 2,019                    | 1,946                    |
|                                 |                      |                          |                          |
| <b>LSD</b>                      | <b>Svjetlo (A)</b>   | <b>Konc. hormona (B)</b> | <b>Interakcije A x B</b> |
| <b>0,01</b>                     | Ns                   | 0,1067                   | 0,5613                   |
| <b>0,05</b>                     | ns                   | 0,0643                   | 0,2549                   |

Iz navedenoga se može uočiti da su koncentracija hormona i interakcija svjetlost x hormon imali statistički značajan utjecaj na sve ispitivane parametre (duljina, masa i multiplikacijski indeks) kod oba ekotipa češnjaka.

Brojni autori bavili su se problematikom utjecaja svjetlosti i koncentracije hormona na *in vitro* rast. Tako su Tkalec i sur. (2014.) ispitivali utjecaj regulatora rasta na multiplikaciju mladih listova pelargonije. Svaki tretman sadržavao je jednaku koncentraciju (0,1 mg/L) IBA, dok je raspodjela citokinina izvršena u koncentracijama 1,0 mg/L BAP, 1,5 mg/L BAP, 1,0 mg/L KIN i 1,5 mg/L KIN. Utvrđeno je da je koncentracija hormona BAP značajno utjecala na indeks multiplikacije te su ostvarene veće vrijednosti pri nižoj koncentraciji, dok je kod hormona kinetina veća koncentracija rezultirala i najvećim indeksom multiplikacije. Hoffman i sur. (2016.) ispitivali su utjecaj svjetlosnog režima i koncentracije IBA na razvoj adventivnog korijenja topole. Utvrđene su statistički značajne razlike između tretmana fluorescentnim i LED osvjetljenjem, pri čemu se fluorescentno osvjetljenje pokazalo pogodnijim za razvoj adventivnog korijenja. Nije utvrđen statistički značajan utjecaj koncentracije IBA na razvoj korijenja. Afshari i sur. (2011.) ispitivali su utjecaj svjetla i regulatora rasta na indukciju kalusa kod vrste *Brassica napus* L. Utvrđeno je da su svi faktori (medij, eksplantat, kultivar i svjetlost) imali značajan utjecaj na masu kalusa, ne samo pojedinačno nego i u interakciji. Batista i sur. (2016.) navode da je utvrđen značajan utjecaj kvalitete svjetla na *in vitro* rast vrste *Lippia alba*. Ngomuo i sur. (2016.) su ispitivali utjecaj auksina i citokinina na *in vitro* rast i razvoj *Musa sp.* var. Yangambi. Utvrđen je značajan utjecaj koncentracije BAP na broj formiranih izdanaka kao i utjecaj interakcije BAP x IAA na svježju masu.

O utjecaju kvalitete svjetlosti na *in vitro* rast češnjaka nije objavljen veliki broj radova, dok ih je više objavljeno o utjecaju koncentracije hormona na *in vitro* rast. Tako Takagi i Qu (1995.) navode da je utvrđen pozitivan utjecaj daleko-crvenog svjetla na *in vitro* rast i razvoj lukovica češnjak. Haque i sur. (2003.) su ispitivali utjecaj hormona 2,4-D i BAP na *in vitro* regeneraciju češnjaka. Najveći rast kalusa zabilježen je pri 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BAP, najveća proliferacija pri 2,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BAP, a najveći broj regeneriranih biljčica kod 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BAP. Scotton i sur. (2013.) navode da se MS medij sa 8,8  $\mu$ M BAP i 0.1  $\mu$ M NAA pokazao boljim za *in vitro* regeneraciju češnjaka u odnosu na medij s 4,6  $\mu$ M kinetina. Mehta i sur. (2013.a) navode da je koncentracija 1,0 mg/L IBA utvrđena kao optimalna za *in vitro* razvoj korijena češnjaka.

Najveći postotak preživljavanja u *in vitro* kulturi kod Slavanskog ozimog češnjaka imali su uzorci koji su bili tretirani bijelim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP, a najmanji postotak uzorci tretirani bijelim svjetlom uz 1,0 mg/L BAP. Kod češnjaka Vincek najveći postotak preživljavanja u *in vitro* kulturi imali su uzorci koji su bili tretirani plavim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP, a najmanji postotak uzorci tretirani bijelim svjetlom uz 1,0 mg/L BAP. Uzorci Slavanskog ozimog češnjaka imali su znatno veći postotak preživljavanja u *in vitro* kulturi u odnosu na češnjak Vincek (Tablica 8.).

Tablica 8. Postotak preživljavanja u *in vitro* kulturi

| Varijanta tretiranja                                                         | Slavonski ozimi | Vincek  |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------|
| A1 B1                                                                        | 68,7 %          | 25,7 %  |
| A1 B2                                                                        | 93,3 %          | 41,1 %  |
| A2 B1                                                                        | 70,6 %          | 29,4 %  |
| A2 B2                                                                        | 73,3 %          | 55,88 % |
| A1 – bijelo svjetlo, A2 – plavo svjetlo, B1 – 1,0 mg/L BAP, B2 - 1,5mg/L BAP |                 |         |

Glavni uzrok smanjenog postotka preživljavanja su kontaminacije. Cassels (1991.) navodi da kontaminacija u kulturi tkiva može poteći iz dva izvora, prijenosom mikroorganizama na površini ili u tkivu eksplantata, ili zbog nepravilnih postupaka prilikom rada u laboratoriju. Većina mikroorganizama prisutnih intercelularno u biljnom tkivu sposobna je za rast na hranjivom mediju u kulturi tkiva, iako kod nekih može doći do inhibicije uslijed velike koncentracije soli i šećera ili visoke pH vrijednosti (Cassels i sur., 1988.)

Generalno su duljina i masa češnjaka Vincek bile najveće kod tretmana s plavim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP, a duljina i masa Slavanskog ozimog češnjaka kod tretmana bijelim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP. Također, najveći postotak preživljavanja kod češnjaka Vincek su imali uzorci iz tretmana s plavim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP, a kod Slavanskog ozimog češnjaka uzorci iz tretmana s bijelim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP.

Razlika u dobivenim rezultatima između ispitivanih ekotipova češnjaka, vezano za utjecaj svjetlosti i hormona na *in vitro* rast, može se pripisati njihovoj različitoj genetskoj osnovi. Tako Parađiković i sur. (2015.) navode da ekotip češnjaka ima značajan utjecaj na morfološke pokazatelje kao što su masa i broj češnjeva, kako kod češnjaka razmnoženog klasičnim načinom tako i kod onoga dobivenog *in vitro* tehnikama. Scotton i sur. (2013.) također navode da pored tipa i fiziološkog stanja eksplantata na *in vitro* regeneraciju biljke znatno utječe i sam genotip. Razlike u postotku preživljavanja u kulturi mogle su nastati i kao posljedica različitog zdravstvenog stanja eksplantata.

Budući da o utjecaju spektra svjetlosti i koncentracije hormona na *in vitro* rast češnjaka nema mnogo objavljenih radova svakako bi trebalo obaviti dodatna i opsežnija istraživanja o toj problematici.

## 5. Zaključak

Na temelju laboratorijskih istraživanja, provedenih u Laboratoriju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, tijekom akademske 2014./2015. godine, u svezi utjecaja različitog spektra svjetla i koncentracije hormona na rast eksplantata češnjaka *in vitro*, može se zaključiti sljedeće:

1. Utvrđen je statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) koncentracije hormona i interakcije svjetlost x hormon na sve ispitivane parametre (duljina, masa i multiplikacijski indeks) kod oba ekotipa češnjaka.
2. Utvrđen je statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) svjetlosti na masu i multiplikacijski indeks češnjaka Vincek.
3. Utvrđen je statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) svjetlosti na masu i duljinu Slavanskog ozimog češnjaka.
4. Najveća duljina i masa češnjaka Vincek, kao i najveći postotak preživljavanja, zabilježeni su kod tretmana plavim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP.
5. Najveća duljina i masa Slavanskog ozimog češnjaka, kao i najveći postotak preživljavanja, zabilježeni su kod tretmana bijelim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP.

## 6. Popis literature

- Abo El-Nil, M. M. (1977.): Organogenesis and embryogenesis in callus culture of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Sci Lett, 9: 259-264.
- Afshari, R. T., Angoshtari, R., Kalantari, S. (2011.): Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. Plant Omics Journal, 4(2): 60-67.
- Batista, D. S., de Castro, K. M., da Silva, A. R., Teixeira, M. L., Sales, T. A., Soares, L. I., Cardoso, M. G., Santos, M. O., Viccini, L. F., Otoni, W. C. (2016.): Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). In Vitro Cell Dev Biol-Plant.
- Bello-Bello, J. J., Martinez-Estrada, E., Caamal-Velazquez, J. H., Morales-Ramos, V. (2016.): Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). African Journal of Biotechnology, 15(8): 272-277.
- Bourget, C. M. (2008.): An introduction to light-emitting diodes. HortSci, 43: 1944-1946.
- Briggs, W. R., Onley, M. A. (2001.): Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin and one superchrome. Plant Physiol., 94:448-454.
- Cassells, A. C. (1991.): Problems in tissue culture: culture contamination. In: Debergh, P., Zimmerman, R. H. (1991.): Micropropagation - Technology and Application. pp. 31-44.
- Cassells, A.C., Harmey, M.A., Carney, B.F., McCarthy, E., McHugh, A. (1988.): Problems posed by cultivable bacterial endophytes in the establishment of axenic cultures of *Pelargonium x domesticum*: the use of *Xanthomonas pelargonii*-specific ELISA, DNA probes and culture indexing in the screening of antibiotic treated and untreated donor plants, Acta Hort 225: 153–162.
- Charoensub, R., Kritsanamara, A. (2011.): Fluorescent lamps for energy saving in plant tissue culture. Proceedings of the 49th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart University, Thailand, 1-4 February, 2011. Volume 1. Subject: Plants 2011 pp.304-312 ref.10.

- Chee, R., Pool, R. M. (1989.): Morphogenic responses to propagule trimming, spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 114(2): 350-354.
- Dixit, V., Rai, S. P., Chaudhary, B. R. (2013.): *Allium sativum*: four-step approach to efficient micropropagation. Int. J. Innov. Biol. Res., 2(1): 6-14.
- Dixon, R. A., Gonzales, R. A. (1994.): Plant cell culture: A practical approach. Oxford University Press, Oxford, 1994.
- Eady, C. C. (1995.): Towards the transformation of onions (*Allium cepa*). New Zeland Journal of Crop and Horticulture Science, 23(3): 239-250.
- Economou, A. S., Read, P. E. (1987.): Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. HortScience, 22: 751-754.
- Etog, T., Simon, P. W. (2002.): Diversity, fertility and seed production of garlic. In: Rabinowitch, H. D., Currah, L. (eds.) *Allium* crop science: recent advances. CAB International, Wallingford.
- Fraszczak, B. (2013.): Effect of short-term exposure to red and blue light on dill plants growth. Horticulture science, 40(4):177-185.
- Gautheret, R. (1939.): Sur la possibilite' de re' aliser la culture inde' finie des tissues de tubercules de carotte. C. R. Soc. Biol. Paris 208:118–120.
- Goh, C. H. (2009.): Phototropins and chloroplast activity in plant blue light signaling. Plant signaling and behavior, 4:693-695.
- Gull, I., Noreen, A., Aslam, M. S., Athar, M. A. (2014.): Comparative effect of different phytohormones on the micropropagation of *Allium sativum*. Pak. J. Biochem. Mol. Biol., 47(1-2): 121-124.
- Gupta, S. D., Jatothu, B. (2013.): Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. Plant Biotechnol. Rep. 7(3):211-220.
- Haberlandt, G. (1902.): Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J. 111, 69–92.
- Haque, M. S., Wada, T., Hattori, K., van KLAS, L.H.W., de Klerk, G.J. (2000.): Garlic roots for micropropagation through *in vitro* bulblet formation. Proc. XXV Int. Hort. Cong. Part

10. Application of biotechnology and molecular biology and breeding, *in vitro* culture, Brussels, Belgium, 2-7 August, 1998, Acta Hort, 520:45-52.

Haque, M. A., Nath, U. K., Ahmad, Q. N., Alam, S. (2003.): Effect of 2,4-D and BAP on *in vitro* regeneration of garlic. Online Journal of Biological Sciences, 2(12): 771-774.

Haque, M. S., Wada, T., Hattori, K. (2003.): Shoot regeneration and bulblet formation from shoot and root meristem of garlic cv Bangladesh local. Asian journal of plant sciences, 2(1): 23-27.

Hoffman, A. P., Adams, J. P., Nelson, A. (2016.): Effects of light regime and IBA concentration on adventitious rooting of an eastern cottonwood (*Populus deltoides*) clones. Proceedings of the 18th biennial southern silvicultural research conference, pp. 478-485.

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

Jang, Y. S., Oh, Y. B., Choi, I. H., Song, Y. S., Park, J. H. (2000.): Effect of the concentration and treatment period of colchicine on polyploid formation in suspension culture of callus derived from shoot apex of garlic (*Allium sativum* L.). J. Kor. Soc. Hort. Sci, 41(2):157-160.

Jelaska, S. (1994.): Kultura biljnih stanica i tkiva – Temeljna istraživanja i primjena. Školska knjiga, Zagreb, 1994.

Kang, B., Grancher, N., Koyffman, V., Lardemer, D., Burney, S., Ahmad, M. (2008.): Multiple interactions between cryptochrome and phototropin blue-light signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. Planta, 227:1091-1099.

Keller, E. R. J., Senula, A. (2013.) Micropropagation and cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.). In: Maurizio Lambardi et al. (eds.): Protocols for micropropagation of selected economically important horticultural plants, Methods in molecular biology, vol 11013. Springer Science Business Media, New York, 2013.

Kim, E. K., Hahn, E. J., Murthy, H. N., Paek, K. Y. (2003.): High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 73: 231-236.

- Kozai, T., Fujiwara, K., Hayashi, M., Aitken-Christie, J. (1992.): The *in vitro* environment and its control in micropropagation, pp- 247-282. In: Kurata, K., Kozai, T. (eds.): Transplant Production Systems. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lin, K.- H., Huang, M.-Y., Hunag, W.-D., Hsu, M.-H., YAng, Z.-W., Yang, C.-M. (2013.): The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, developmnet, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). Scientia Horticulturae, 150:86-91.
- Linsmaier, E. M., Skoog, F. (1965.): Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant., 18(1):100 – 127.
- Luciani, G. F., Mary, A. K., Pellegrini, C., Curvetto, N. R. (2006.): Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. Plant Cell Tiss Organ Cult, 87: 139-143.
- Maggioni, L., Corti, C., Fogher, C. (1989.): Callus induction, ploidy level and plant regeneration in *in vitro* garlic (*Allium sativum* L.) cultures. J. Genet. and Breed., 43:251-254.
- Mahajan, R., Sharma, K., Bandryal, S., Jamwal, P., Billowria, P. (2013.): *In vitro* propagation and cryopreservation of snow mountain garlic endemic to himalaya region. Internationa Journal of Advanced Biotechnology and Research, 4(3): 372-379.
- Malik, C. P., Wadhwani, C., Kaur, B. (2009.): Crop breeding and biotechnology. Point publisher, 2009. pp 278.
- Martin – Urdiroz, N., Garrido-Gala, J., Martin, J., Barandiaran, X. (2004.): Effect of light on the organogenic ability of garlic roots using a one step *in vitro* system. Plant Cell Rep, 22:721-724.
- Masuda, K., Hatakeyama, E., Ito, A., Takahashi, S., Inoue, M. (1994.): Micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). Bul. Akita Pref. College Agr., 20:43-48.
- Mehta, J., Syedy, M., Upadhyay, D., Soni, P., Sharma, S., Khamora, N. (2013.a): An efficient method for microproagation of garlic (*Allium sativum* L.) by somatic embriogenesis and artifical seed preparation with somatic embryo. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, 3(2): 85-89.

- Mehta, J., Sharma, A., Sharma, N., Megwal, S., Sharma, G., Gehlot, P., Naruka, R. (2013.b): An improved method for callus culture and *in vitro* propagation of garlic (*Allium sativum* L.). International Journal of Pure and Applied Bioscience, 1(1): 1-6.
- Morrow, R. C. (2008.): LED lighting in horticulture. HortSci, 43: 1947-1950.
- Nagakubo, T., Nagasawa, A., Ohkawa, H. (1993.): Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. Plant Cell Tiss Org Cult, 32:175-183.
- Ngomuo, M., Mneney, E., Ndakidemi, P. (2013.): The effects of auxins and cytokinin on growth and development of (*Musa* sp.) var. Yangambi explants in tissue culture. American Journal of Plant Sciences, 4: 2174-2180.
- Nobécourt, P. (1939.): Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissues végétaux. Compt. Rendus Soc. Biol. Lyon 130 1270–1271.
- Novak, F. J. (1990.): *Allium* tissue culture. In: Rabinowitch DH and Brewster JL (Eds.) Onions and Allied Crops. CRC, Florida. 1: 233-250.
- Parađiković, N., Vinković, T., Štolfa, I., Tkalec, M., Has-Schon, E., Andračić, I., Parađiković, L., Kraljićak, J. (2012.): Antioksidacijska aktivnost ozimoga slavonskoga češnjaka (*Allium sativum* L.). Poljoprivreda, 18(2):44-49.
- Parađiković, N., Vinković, T., Tkalec, M., Kraljićak, J., Vinković Vrček, I., Teklić, T., Ćosić, J., Lončarić, R., Štolfa, I. (2015.): Uzgoj i njega autohtonog češnjaka (znanost i praksa). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 2015.
- Patena, L. F., de la Rosa, B. A., Rosario, T. L. (1991.): *In vitro* response of garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*Allium ascalonicum* L.) to 6-benzylaminopurine, kinetin, 2-isopentenyladenine, 1-napthaleneacetic acid and mannitol. Philipp. J. Crop Sci., 26(1): 25-28.
- Rajapakse, N. C., Shahak, Y. (2007.): Light quality manipulation by horticulture industry. In: Whitelam, G. C., Halliday, K. J. (eds.), Light and Plant Development. Oxford, Blackwell Publishing: 290-312.
- Reuveni, M., Evenor, D. (2007.): On the effect of light on shoot regeneration in petunia. Plant Cell Tissue Organ Cult. 89(1):49-54.

- Robledo-Paz, A., Tovar-Soto, H.M. (2012.): Biotechnological Tools for Garlic Propagation and Improvement. In: Innovations in Biotechnology (editor: Eddy C. Agbo). InTech, 2012.
- Roksana, R., Alam, M. F., Islam, R., Hossain, M. M. (2002.): *In vitro* bulblet formation from shoot apex in garlic (*Allium sativum* L.). Plant Tissue Cult. 12(1): 11-17.
- Sata, S. J., Bagatharia, S. B., Thaker, V. S. (2001.): Induction of direct somatic embryogenesis in garlic (*Allium sativum* L.). Meth. Cell. Sci., 22:299-304, ISSN 1381-5741.
- Schwann, T., Schleyden, M. J. (1847.): Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants. London: Printed for the Sydenham Society
- Scotton, D. C., Benedito, V. A., de Molfetta, J. B., Rodrigues, B. I. F. P., Tulmann-Neto, A., Figueira, A. (2013.): Response of root explants to *in vitro* cultivation of marketable garlic cultivars. Horticultura Brasileira, 31:80-85.
- Shuto, H., Abe, T., Sasahara, T. (1993.): *In vitro* propagation of plants from root apex derives calli in Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler) and garlic (*Allium sativum* L.). Jpn. J. Breed., 43:349-354.
- Skoog, F., Miller, C. O. (1957.): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118–131.
- Takagi, H., Qu, Y. (1995.): Effects of light quality, photoperiod and cold treatment on *in vitro* bulbing of garlic shoot tip. Acta Horticulturae, 393:181-188.
- Tapia, M. I. (1996.): Callus induction, organogenesis and *in vitro* plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). Agro Ciencia, 12(2): 149-154.
- Taskin, H., Baktemur, G., Kurul, M., Buyukalaca, S. (2013.): Use of tissue culture techniques for producing virus free plant in garlic and their identification through real time PCR. The Scientific World Journal, Volume 2013, Article ID 781282, 5 pages.
- Teklić, T. (2012.): Fiziologija bilja u povrćarstvu i cvjećarstvu. Interna skripta, Poljoprivredni fakultet Osijek, 2012.
- Tkalec, M., Parađiković, N., Vinković, T., Zeljković, S. (2014.): Utjecaj regulatora rasta na multiplikaciju mladih listova pelargonije. 49. Hrvatski i 9. Međunarodni Simpozij Agronoma, 16.-21. veljače, Dubrovnik, Hrvatska. Zbornik radova, str. 329-333.

Ul-Haq, I., Dahot, M. U. (2007.): Morpho-physiological aspects of micro-propagating banana under different hormonal conditions. Asian Journal of Plant Sciences, 6(3):496-501.

Utami, F. T., Haliani, H., Muslimin, M., Suwastika, I. N. (2013.): Organogenesis tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) lokal napu secara in vitro pada medium MS dengan penambahan IAA dan BAP. Online Journal of Natural Science, 2(2): 19-26.

Verbeek, M., Van Dijk, P., Van Well, P.M.A. (1995.): Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem tip culture. Eur. J. Plant. Pathol., 101:231-239.

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

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

Wang, H. I., Kang, Y. Q., Zhang, C. J. (1994.): Embryogenesis via culture of garlic sprout leaf. Acta Agri Boreali Sin, 9(1):92-94.

<http://faostat3.fao.org>

## 7. Sažetak

Primjena tehnika kulture tkiva i stanica u proizvodnji češnjaka započela je 70-ih godina prošloga stoljeća. Navedene tehnike pokazale su se boljima u odnosu na klasičnu reprodukciju češnjevima, budući da zahtijevaju samo stanice ili male dijelove tkiva za dobivanje velikog broja biljaka. Kvaliteta svjetlosti predstavlja jedan od najvažnijih okolišnih čimbenika čijom kontrolom je moguće regulirati *in vitro* rast i razvoj. Odabirom koncentracije i vrste hormona, kao ključne komponentne hranjive podloge, moguće je odrediti smjer razvoja biljnih stanica u kulturi. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi utjecaj različitog spektra svjetla i koncentracije hormona na početni porast eksplantata češnjaka *in vitro*. U istraživanje su bila uključena dva ekotipa češnjaka, Slavonski ozimi (Hrvatska) i Vincek (Slovenija). Kao eksplantati korišteni su dijelovi klice češnjeva češnjaka. Hranjiva podloga pripremljena je prema recepturi Linsmaier i Skoog (1965.). Za istraživanje su korištene dvije različite varijante hranjive podloge (1,0 mg/L BAP i 1,5 mg/L BAP) te dvije varijante osvjetljenja (bijelo svjetlo i plavo svjetlo). Nakon dva tjedna uzgoja u kulturi određeni su masa, duljina i multiplikacijski indeks ispitivanih ekotipova. Utvrđen je statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) koncentracije hormona i interakcije svjetlost x hormon na sve ispitivane parametre (duljina, masa i multiplikacijski indeks) kod oba ekotipa češnjaka. Najveća duljina i masa češnjaka Vincek, kao i najveći postotak preživljavanja, zabilježeni su kod tretmana plavim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP. Najveća duljina i masa Slavanskog ozimog češnjaka, kao i najveći postotak preživljavanja, zabilježeni su kod tretmana bijelim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP.

Ključne riječi: češnjak, *in vitro*, svjetlost, hormon

## 8. Summary

The use of tissue and cell culture techniques in garlic production began in the 1970s. These techniques have been shown to be superior to classical reproduction by cloves, as they only require cells or small parts of the tissue to obtain a large number of plants. Light quality is one of the most important environmental factors which can regulate *in vitro* growth and development. Hormones represent a key medium component and by selecting their concentration and type it is possible to define the direction of plant cell growth in culture. The aim of this study was to determine the influence of different light spectrum and hormone concentration on the initial growth of garlic *in vitro*. The study included two garlic ecotypes, Slavonian winter (Croatia) and Vincek (Slovenia). Clove germs were used as explants. Culture medium was prepared according to Linsmaier and Skoog (1965). Two different variants of hormone concentration (1.0 mg/L BAP and 1.5 mg/L BAP) and light spectrum (white light and blue light) were used as treatments. After two weeks of cultivation, growth parameters (mass, length and multiplication index) were measured. Results showed a statistically significant effect ( $p < 0.01$ ) of the hormone concentration and the interaction of light x hormone on all examined parameters (mass, length and multiplication index) in both garlic ecotypes. The highest length and mass of garlic Vincek, as well as the highest survival rate, were observed at blue light + 1.5 mg/L BAP treatment. The highest length and mass of Slavonian winter garlic and the highest survival rate, were observed at white light + 1.5 mg/L BAP treatment.

Key words: garlic, *in vitro*, light, hormone

## 9. Popis tablica

| Br.        | Naziv tablice                                                                                    | Str. |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tablica 1. | Sastojci i količine sastojaka za pripremu hranjive podloge                                       | 16   |
| Tablica 2. | Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na visinu češnjaka Vincek                             | 22   |
| Tablica 3. | Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na masu češnjaka Vincek                               | 23   |
| Tablica 4. | Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na multiplikacijski indeks češnjaka Vincek            | 23   |
| Tablica 5. | Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na visinu Slavanskog ozimog češnjaka                  | 24   |
| Tablica 6. | Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na masu Slavanskog ozimog češnjaka                    | 25   |
| Tablica 7. | Utjecaj svjetlosti i koncentracije hormona na multiplikacijski indeks Slavanskog ozimog češnjaka | 25   |
| Tablica 8. | Postotak preživljavanja u <i>in vitro</i> kulturi                                                | 27   |

## 10. Popis slika

| Br.      | Naziv slike                                                           | Str. |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|------|
| Slika 1. | Priprema hranjive podloge (foto original; S. Guberac)                 | 16   |
| Slika 2. | Epruvete s hranjivom podlogom (foto original, S. Guberac)             | 17   |
| Slika 3. | Sterilizacija češnjeva (foto original, S. Guberac)                    | 17   |
| Slika 4. | Izdvajanje eksplantanata (foto original, S. Guberac)                  | 18   |
| Slika 5. | Eksplantati pod bijelim i plavim svjetlom (foto original, S. Guberac) | 19   |
| Slika 6. | Mjerenje mase biljaka (foto original; S. Guberac)                     | 20   |
| Slika 7. | Mjerenje duljine biljaka (foto original; S. Guberac)                  | 21   |
| Slika 8. | Umnažanje materijala (foto original; S. Guberac)                      | 21   |

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

### Utjecaj različitog spektra svjetla te koncentracije hormona na rast eksplantata češnjaka *in vitro* Sunčica Guberac

**Sažetak:** Primjena tehnika kulture tkiva i stanica u proizvodnji češnjaka započela je 70-ih godina prošloga stoljeća. Navedene tehnike pokazale su se boljima u odnosu na klasičnu reprodukciju češnjevima, budući da zahtijevaju samo stanice ili male dijelove tkiva za dobivanje velikog broja biljaka. Kvaliteta svjetlosti predstavlja jedan od najvažnijih okolišnih čimbenika čijom kontrolom je moguće regulirati *in vitro* rast i razvoj. Odabirom koncentracije i vrste hormona, kao ključne komponentne hranjive podloge, moguće je odrediti smjer razvoja biljnih stanica u kulturi. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi utjecaj različitog spektra svjetla i koncentracije hormona na početni porast eksplantata češnjaka *in vitro*. U istraživanje su bila uključena dva ekotipa češnjaka, Slavonski ozimi (Hrvatska) i Vincek (Slovenija). Kao eksplantati korišteni su dijelovi klice češnjeva češnjaka. Hranjiva podloga pripremljena je prema recepturi Linsmaier i Skoog (1965.). Za istraživanje su korištene dvije različite varijante hranjive podloge (1,0 mg/L BAP i 1,5 mg/L BAP) te dvije varijante osvjetljenja (bijelo svjetlo i plavo svjetlo). Nakon dva tjedna uzgoja u kulturi određeni su masa, duljina i multiplikacijski indeks ispitivanih ekotipova. Utvrđen je statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) koncentracije hormona i interakcije svjetlost x hormon na sve ispitivane parametre kod oba ekotipa češnjaka. Najveća duljina i masa češnjaka Vincek, kao i najveći postotak preživljavanja, zabilježeni su kod tretmana plavim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP. Najveća duljina i masa Slavenskog ozimog češnjaka, kao i najveći postotak preživljavanja, zabilježeni su kod tretmana bijelim svjetlom uz 1,5 mg/L BAP.

**Rad je izrađen pri:** Poljoprivredni fakultet u Osijeku

**Mentor:** prof.dr.sc. Nada Parađiković

**Broj stranica:** 40

**Broj grafikona i slika:** 8

**Broj tablica:** 8

**Broj literaturnih navoda:** 71

**Broj priloga:** -

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** češnjak, *in vitro*, svjetlost, hormon

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

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

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate thesis

### **Influence of different light spectrum and hormone concentration on *in vitro* growth of garlic explants** **Sunčica Guberac**

**Abstract:** The use of tissue and cell culture techniques in garlic production began in the 1970s. These techniques have been shown to be superior to classical reproduction by cloves, as they only require cells or small parts of the tissue to obtain a large number of plants. Light quality is one of the most important environmental factors which can regulate *in vitro* growth and development. Hormones represent a key medium component and by selecting their concentration and type it is possible to define the direction of plant cell growth in culture. The aim of this study was to determine the influence of different light spectrum and hormone concentration on the initial growth of garlic *in vitro*. The study included two garlic ecotypes, Slavonian winter (Croatia) and Vincek (Slovenia). Clove germs were used as explants. Culture medium was prepared according to Linsmaier and Skoog (1965). Two different variants of hormone concentration (1.0 mg/L BAP and 1.5 mg/L BAP) and light spectrum (white light and blue light) were used as treatments. After two weeks of cultivation, growth parameters (mass, length and multiplication index) were measured. Results showed a statistically significant effect ( $p < 0.01$ ) of the hormone concentration and the interaction of light x hormone on all examined parameters (mass, length and multiplication index) in both garlic ecotypes. The highest length and mass of garlic Vincek, as well as the highest survival rate, were observed at blue light + 1.5 mg/L BAP treatment. The highest length and mass of Slavonian winter garlic and the highest survival rate, were observed at white light + 1.5 mg/L BAP treatment.

**Thesis performed at:** Faculty of Agriculture in Osijek

**Mentor:** prof.dr.sc. Nada Parađiković

**Number of pages:** 40

**Number of figures:** 8

**Number of tables:** 8

**Number of references:** 71

**Number of appendices:** -

**Original in:** Croatian

**Key words:** garlic, *in vitro*, light, hormone

**Thesis defended on date:**

**Reviewers:**

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

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