Posmeđenje eksplantata masline (Olea europaea L.)u kulturi in vitro

Frančišković, Lina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:506880

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYER
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Lina Frančišković, apsolvent
Diplomski studij Vinogradarstvo, voćarstvo i vinarstvo
Smjer Voćarstvo

POSMEĐENJE EKSPLANTATA MASLINE (*OLEA EUROPAEA L.*) U KULTURI *IN VITRO*

Diplomski rad

Osijek, 2018

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Lina Frančišković, apsolvent
Diplomski studij Vinogradarstvo, voćarstvo i vinarstvo
Smjer Voćarstvo

POSMEĐENJE EKSPLANTATA MASLINE (*OLEA EUROPAEA L.*) U KULTURI *IN VITRO*

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:
1. izv. prof. dr. sc. Brigita Popović, predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor
3. Doc.dr.sc. Mato Drenjančević, član

Osijek, 2018

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. PREGLED LITERATURE 2

2.1.Povijest uzgoja masline 2

2.2. Biologija masline 4

2.3. Botanička klasifikacija 5

2.4. Morfologija masline 5

2.4.1. Korijen 6

2.4.2. Deblo 7

2.4.3. Grančice 8

2.4.4. List 9

2.4.5. Cvijet 10

2.4.6. Plod 11

2.5. Ekologija masline 14

2.5.1. Klima 14

2.5.2. Reljef (orografija) 17

2.6. Proizvodnja masline 18

2.6.1. Proizvodnja masline u Hrvatskoj 18

2.6.2. Najzastupljenije sorte masline u Hrvatskoj 19

2.6.3. Proizvodnja masline u Europi i svijetu 20

2.7. Razmnožavanje masline 23

2.7.1. Generativno razmnožavanje 23

2.7.2. Vegetativno razmnožavanje 23

2.7.3. Biotehnologija (mikropropagacija) 26

3. MATERIJALI I METODE 30

3.1. Cilj istraživanja i laboratorij za in vitro 30

3.2. Sortiment u pokusu 32

3.2.1. Oblica 32

3.2.2. Drobnica 33

3.2.3. Rosinjola 33

3.3. Medij (podloga) za uvođenje u kulturu tkiva i radni prostor 34

3.4. Sterilizacija i inicijacija početnog materijala (eksplantata) 34

3.5. Tretmani u pokusu 36

3.6. Mjerenja u pokusu 38

3.7. Obrada podataka 38

4. REZULTATI 39

4.1. Kontaminacija nakon 15 dana 39

4.2 Posmeđenje nakon 15 dana 40

4.3. Proliferacija nakon 30 dana po sortama 42

4.4. Mortalitet eksplantata nako 30 dana stabilizacije 43

5. RASPRAVA 44

5.1. Razlike na razini cijelog pokusa 44

5.2. Razlike između primijenjenih tretmana po kultivarima 46

5.2.1. Drobnica 46

5.2.2. Rosulja 47

5.2.3. Oblica 49

5.3. Razlike između tretmana po kultivaru u fenolnom posmeđenju eksplantata 50

6. ZAKLJUČAK 51

7. POPIS LITERATURE 53

8. SAŽETAK 56

9. SUMMARY 57

10. POPIS TABLICA 58

11. POPIS SLIKA 60

12. POPIS GRAFIKONA 61

1. UVOD

Maslina (*Olea europaea L.*) predstavlja jednu od ekonomski najvažnijih višegodišnjih voćnih kultura koje se uzgajaju u mediteranskoj regiji RH. Zadnjih godina veliki je trend i ekspanzija podizanja intenzivnih plantažnih nasada masline u cijelom svijetu. Povećane potrebe za sadnim materijalom predstavljaju jedan od razloga velikog interesa istraživača i rasadničara u standardizaciji, poboljšanju ili razvoju novih tehnika razmnožavanja masline. Upravo mikropropagacija, odnosno *in vitro* model predstavlja pogodno rješenje. Međutim, i u ovom modelu ipak nije sve tako idealno i jednostavno kako se čini. Mnogi istraživači iznose teškoće u dezinfekciji ili stvaranju aseptične kulture, štetnoj fenolnoj oksidaciji eksplantata, otpuštanju istog u medij, jakom utjecaju genotipa na proliferaciju, izraženoj apikalnoj dominaciji, visokim troškovima citokinina – zeatin (najučinkovitiji hormon u indukciji proliferacije) i dr. Kao alternativa zeatinu koriste se regulatori rasta kao što su: BAP (6-benzylaminopurin), TDZ (thidiazuron) ili kinetin koji mogu inducirati proliferaciju, ali ta proliferacija je znatno niža te se stvaraju vrlo kratki izdanci s velikim kalusom u bazi eksplantata. Vrlo učinkovita alternativa je i u uporabi kokosove vode koja u svom sastavu ima visoku razinu zeatina, te se često koristi u mnogim protokolima mikropropagacije nekih drugih voćnih kultura.

Sva tkiva, odnosno stanice koje rastu sadrže fenolne komponente. Oksidacija fenolnih komponenata (polifenoloksidaza i peroksidaza) koje se oslobađaju kroz rez na eksplantatu uzrokuje vrlo visoki mortalitet eksplantata (posmeđenje eksplantata i medija). Stoga je vrlo važno i nužno na vrijeme reagirati, odnosno upotrijebiti jednu ili kombinaciju nekoliko različih metoda u prevenciji i spriječavanju ove negativne pojave. Korištenje predtretmana uporabom PVP (polyvinylpyrrolidone), antioksidanata (askorbinska i citrična kiselina), aktivnog ugljena, učestalom subkultivacijom, faza mraka (smanjenje enzimatske aktivnosti), smanjenje temperature, itd samo su neke od metoda redukcije fenolnog posmeđenja i njegovog nakupljanja u mediju.

Ovo istraživanje provedeno je u cilju ispitivanja mogućnosti mikropropagacije, odnosno sterilizacije i smanjenja fenolne oksidacije uporabom nekih predtretmana i određenih hormonskih tretmana na proliferaciju nodijalnih eksplantata masline.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Povijest uzgoja masline

U stručnoj literaturi se navodi (*Pagnol, J. 1975.*) da je čovjek 6 000 godina prije Krista poznavao maslinu kao uljaricu i od tada ona zauzima posebno mjestu u životu ljudi na prostorima Mediterana. Različite su pretpostavke o mjestu postanka pitome masline iz oleastera. Prevladava mišljenje da se to dogodilo nedaleko od jugoistočnih obala Mediterana, na prostorima Palestine i Sirije, koji su povezivali Egipat sa Malom Azijom i Mezopotamijom. Sa sigurnošću se tvrdi da je na tim prostorima već u trećem tisućljeću prije Krista bio proširen uzgoj pitome masline. Najraniji dokumenti potvrđuju da se 2 600 godine prije Krista, maslinovo ulje iz Sirije izvozilo u Egipat.

Tokom dugog razdoblja kultiviranja masline i proizvodnje maslinovog ulja su usavršeni. Razvojem starih civilizacija uzgoj maslina je proširen na čitav Mediteran. Na tim prostorima između toplih pustinjskih vjetrova i svježih strujanja sa Atlantika, maslina je našla savršen ambijent razmjene. Na osnovu opisanog povijesnog razvoja, smatra se da su Feničani i Grci prenijeli maslinu na zapadne obale mediterana. U 16 stoljeću španjolski i portugalski brodovi su prenijeli maslinu na područje Latinske Amerike, Meksiko, a kasnije i u Sjevernu Ameriku, Kinu, Japan, Pakistan.

Danas se zahvaljujući suvremenim metodama, na osnovu analize DNA iz kloroplasta različitih vrsta roda *Olea*, pokazalo da vrsta *Olea Laperrinei* (iz Sahare), *Olea Maroccana* (u Maroku), *Olea Cerasiformis* (Kanarski otoci) imaju vrlo sličnu DNA kako međusobno tako i sa pitomom maslinom što ukazuje na isto podrijetlo. Istovremeno, istraživanja stotine uzoraka pitome masline iz cijelog Mediterana, dovela su do zaključka da je selekcija izvršena u različitim područjima (*Jančić, 2005*), a da su sve biljke nastale od divlje mediteranske masline prenesene na čitav Mediteran.

Danas se maslina uzgaja ne samo na Sredozemlju već se proširila i sada raste i tamo gdje je prije nije bilo: Kaliforniji, Australiji, Novom Zelandu, odnosno na svim kontinentima.

Uz maslinu s razlogom često ide određenje stara, besmrtna, izvanvremenska, biblijska vrsta. O starosti pojedinih maslina postoje različita mišljenja. Neki tvrde da su stare više tisuća godina, drugi ne više od petsto.

Na jugu Iraka raste maslina za koju kršćansko stanovništvo vjeruje da je drvo preko koga su Adam i Eva izgani iz raja i spustili se na zemlju.

U Getsemanskog vrtu (slika 1.) u predgrađju Jeruzalema, žive masline ispod kojih je Krist, moleći se proveo svoje posljednje sate ljudske slabosti i pokolebanosti pred smrću. U Ateni još uvijek postoji maslina pod kojom je sjedio i razmišljao grčki filozof Platon.



Slika 1. Getsemanski vrt **(**Izvor: Internet)

U stvari teško je odrediti starost masline, a posebno stoljetnih stabala koja su šuplja, na kojima godovi ne postoje. Obim debla kod određivanja starosti nije mjerodavan, jer ovisi o ekološkim uvjetima u kojima je maslina rasla. Tako maslina na teškom kršu raste stoljećima patuljasta, grmolika biljka, bez značajnijeg pomaka debla i ostalih dijelova.

Teškoće pri određivanju starosti masline uvećava i velika sposobnost regeneracije koju ima maslina. Maslina se može obnoviti iz panja ili iz samog korijena.

2.2. Biologija masline

Maslina potječe iz Sredozemnog bazena (*Zohary i Spigel-Roy, 1975*), a kultivirana je u njegovom istočnom dijelu. Veoma je dobro prilagođena na duga i suha ljeta u uvjetima suptropske klime *(Lavee, 1992*). Svoju povišenu sposobnost preživljavanja duguje određenim kapacitetima razvoja, kao što su: specifična anatomija lista, odnos izdanka-korijen, prilagođenost korijenovog sustava na uvjete sredine i visoka sposobnost za morfogenetsko podmlađivanje (obnavljanje).

Sve je očiglednije da do sada otkriveni metabolički procesi učestvuju u velikoj prilagodljivosti masline na ekstremne uvjete sredine (*Fotanazza i Preziosi, 1989.*). S druge strane, vrsta *Olea europaea L.* ima genetsku sposobnost da se poboljšava u izuzetno povoljnim uvjetima. U relativno toplijim krajevima sa dosta kiše ili uz često navodnjavanje ljeti, teži da se razvije veliko drvo sa visokim stablom i raskošnim vegetativnim razvojem, bez obzira na ljetne kiše. Teško da bi ovakav razvoj mogao da se dogodi u krajevima na sjeveru čija je klima hladnija.

Maslina je drvo koje rađa alternativno u svim uvjetima razvitka i potrebna je agrotehnička intervencija da bi se ova karakteristika spriječila ili svela na minimum. Ova alternativnost u rađanju povezana je s godišnjim razvitkom i endogenim čimbenicima. I bujnost i godišnji vegetativni razvitak, kao i dimenzije ploda mnogo zavise o novoj rodnosti, tako da u godinama visoke rodnosti rast mladica je ograničen.

Maslina zahtjeva povećani intezitet svjetlosti za diferencijaciju cvjetnih pupoljaka i razvoj sjemenke, pa je kod većine sorti plod lokaliziran po obodu krošnje (*Tombesi i Cartechini, 1986).*

Drvo ima neobičan visok morfogenetski potencijal zbog čega dobro reagira na preoblikovanje i regeneraciju stabla. Nasuprot tome, potencijal za vegetativno razmnožavanje veoma varira kod različitih sorti. Poznate su neke koje se vrlo lako ili teško oživljavaju, ali i sorte sa srednjim potencijalom vegetativnog razmnožavanja (*Hartman i Kesler, 1968; Avidan i Lavee, 1978).*

2.3. Botanička klasifikacija

Maslina zauzima mjestu u sistematici biljaka:

- Odjeljak: *Magnoliaphyta* (*Angiospermae*, skrivenosjemenice)
- Klasa: *Magnoliatae* (*Dicotiledones*, dikotile)
- Podklasa: *Asteridae*
- Nadred: *Laminae* (*Tubiflorae*)
- Red: *Olealeš* Linley 1833 (masline)
- Familija: *Oleaceae* Hoffmannseff et Link 1805 (masline)
- Rod: *Olea* L. (maslina)
- Vrsta: *Olea europaea* L. (maslina)

Podvrste:

- *Olea europaea oleaster* L.
- *Olea europaea sativa* L. (pitoma maslina) (*S. Lavee, 1996.)*

2.4. Morfologija masline

Maslina priprada rodu *Olea*, vrsti *Europaea*, povrsti *Sativa.* Postoje uočljive razlike između morfologije *Olea Europea Eleaster* (divlje, samonikle masline) *i Olea Europaea Sativa* (uzgojene, pitome masline). *Olivastro,* odnosno *Oleastro* ili divlja samonikla maslina (slika 2.) ima sitan plod, sitne listiće, grane su ponekad s bodljama, ona je predstavnik autohtone divlje mediteranske flore.

Maslina je zimzelena biljka. Visina stabla ovisi o sorti, uvjetima sredine, pedoklimatskim uvjetima i naravno načinu uzgoja. Kreće se od 3 do 15 m. U svom prirodnom ambijentu maslina je viševjekovna, odnosno tisućegodišnja.



Slika 2. Divlja maslina (Foto: Frančišković, 2018.)

To joj omogućuje njena sposobnost samoregeneracije koja se postiže spontanim stvaranjem pupoljaka u zoni korijenova sustava, zapravo stvara se jedan specifičan korijenov sustav koji praktično produžava život masline. Prvobitno stablo masline zamjenjuje novim izdancima i tako se nastavlja životni vijek masline.

Jedan specifična odlika masline je stvaranje posebnih tvorevina guke, koje su različitih dimenzija i formiraju se u zoni korijenovog vrata, ali se mogu naći i po čitavom deblu. U prvim godinama hiperplazije su bogate adventivnim pupoljcima. Maslina u fazi plodonošenja formira, zajedno sa ovulama, u zoni korijenovog vrata jedan specifični oblik baze debla koji se naziva narodnim imenom „klada“.

2.4.1. Korijen

Kod generativnog razmnožavanja masline dominira glavni korijen koji je ujedno i centralni (slika 3.). One biljke koje su se razmnožavale vegetativno od početka razvoja imaju višesmjerni korijenov sustav. Biljke sa slabim korijenom mogu formirati zakržljalo stablo koje se ne uspije razviti. Biljke razmnožene vegetativnim putem formiraju od početka višesmjerni korijenov sustav. Osim toga, biljke sa samo jednim korijenom uglavnom slabo

rastu i formiraju zakržljalo drvo koje se često ne uspijeva razviti i dati normalan primjerak. Mladi korijeni su bijele boje, sadrže korijenove dlačice tipiče za dikotiledone. Kako napreduje odrvenjavanje kod starijih korijenova, boja postaje sve tamnija (*Avidan i Lavee, 1978*).



Slika 3. Korijen masline (Izvor: Internet)

U navodnjavanim maslinicima korijenov sustav je bliži površni negdje oko 70-90 cm. Glavni korijen je direktno povezan s jednom od grana, što omogućava interakciju svakog korijena s po jednom specifičnom sekcijom krošnje (*Miranović, 2006*.). Na područjima gdje prevladava suša i kameniti teren, korijen se razvija u potrazi za vodom.

2.4.2. Deblo

S funkcionalne točke gledišta, deblo masline je spoj raznih nezavisnih sekcija. Osnova debla uglavnom se proširuje sa sazrijevanjem stabla u zavisnosti od uvjeta i sorte, obično nakon 10-15 godina.

Ovo proširenje sadrži zonu korijenovog vrata, koja je kod masline vrlo kratka i u mnogim slučajevima se mogu vidjeti počeci glavnih korijena na površini zemlje. Donji dio stabla masline ima izuzetno veliki morfogenetski potencijal.

Kod većine sorti deblo (slika 4.) proizvodi guke, koji predstavljaju volumiozne dijelove sa visokim morfogenetskim potencijalom. Rezovi svaki put izazivaju novu guku, koji u nekim slučajevima mogu dati guke dimenzija do 30 cm.



Slika 4. Deblo masline (Foto: Frančišković, 2018.)

2.4.3. Grančice

Jednogodišnje grančice su te koje donose rod, one mogu biti samo rodne, vegetativne ili mješovite. Rodne i mješovite grane su fleksibilne i duge 5-40 cm.

Drvenasta mladica razvija se iz latentnih pupoljaka, lateralnih ili pak iz guka. Ove mladice su vrlo bujne, obično su to vodopije (slika 5.), a u zavisnosti od sorte i pomotehnike, može ih biti i više ili manje.



Slika 5. Grančice masline (Foto: Frančišković, 2018.)

2.4.4. List

Listovi masline su suprotni i ovalni, sjede na kratkim peteljkama te su uvijeni na rubovima (slika 6.). Lišće je zimzeleno, gusto i kožnato (*Denninger i sur., 1993.*). Listovi se šire kroz tri mjeseca, tijekom proljeća i zamjenjuju se nakon dvogodišnjeg životnog razdoblja; drugi jaz rasta pojavljuje se u jesen (*Dimantoglou i Mitrakos, 1981.*). Listovi imaju stome samo na donjoj površini plojke, odnosno naličju. Njihova sposobnost podvrgavanja dehidraciji ograničena je visokom internom difuzijskom otpornošću, što je posljedica gustog „pakiranja" mezofilnih stanica (*Giono i sur., 1999.*).

Stome (puči) su smještene u pletene trihome koji ograničavaju gubitak vode i čine maslinu relativno otpornom na sušu. Na površini lista prisutne su i višestanične dlačice (*Martin, 1996.).* Slojevi štitastih vlakana na vanjskoj površini listova vjerojatno zahvaćaju topli i vlažni zraka ispod otvora za puči te time smanjuju gubitak vode iz biljke (*Fahn, 1986.*).

Listovi starosti 2 ili 3 godine obično otpadaju u proljeće međutim, kao i kod drugih zimzelena i starije lišće od 3 godine uvijek je prisutno na stablu.



Slika 6. List (Foto: Frančišković, 2016.)

Za list su značajne sljedeće karakteristike:

- Veličina
- Oblik
- Debljina
- Nervatura
- Površina lista
- Stome
- Jačina kutikule

Ove karatkeristike kod lista su bitne zbog produkcije organskih tvari, transpiracije, otpornost prema suši te hladnoći i parazitima. Dimenzije lista mogu varirati ovisno o starosti, sorti, sredini i uvjetima uzgoja. Na listovima masline možemo uvidjeti probleme koji su nastali tijekom ishrane i teških uvjeta. Prvi nedostatak uočit ćemo po smanjenoj zelenkastoj boji lista. Nedostatakom vode listovi će otpasti na jednoj strani krošnje, a ostatak će biti žute boje. Ako dođe do nedostatka svijetlosti to ćemo prepoznati po uvijanju listova.

2.4.5. Cvijet

Cvjetovi su mali, bijeli i grupirani u malim klasterima (vlati) od 10-30, rastu u pazušcu listova u rano proljeće na starim stabljikama od dvije godine, većina stabala su samooplodna (*Brousse i Loussert, 1999*.). Građa cvijeta je uniformna u cijeloj vrsti *Olea Europaea*. Cvijet ima četiri zelena čašićna listića, četiri bijele latice u osnovu spojene i zajedno opadaju na kraju cvjetanja, dva prašnika, a plodnica je smještena u centru čašice.
Boja cvjetova je u fazi razvoja zelene boje (slika 7.), a klorofil odlazi iz latica tek kratko prije otvaranja cvjetova. Ukupan broj cvjetova na cvatima, njegov raspored na dršci i dužina cvati su genetski određeni zbog toga su specifični za svaku sortu.

Dimenzije cvata i broj cvjetova variraju iz godine u godinu, u zavisnosti od fiziološkog stanja biljke i klimatskim uvjeta.



Slika 7. Početak razvoja cvijeta (Izvor: Internet)

Obično se pupoljak formira tokom trenutne sezone, ali pupoljci mogu ostati „uspavani“ dulje od godinu dana i zatim započeti s rastom, stvarajući cvijetove sezonu kasnije od očekivanog (*Martin, 1996*). Oplodnja se uglavnom vrši vjetrom i traje tjedan dana. Dvije vrste cvjetova susrećemo svake sezone: potpuno funkcionalni cvijet koji sadrži prašnik i tučak; i prašničke cvjetove (funkcionalno muški), koji sadrže abortirani tučak i funkcionalne prašnike. Udio potpunih i funkcionalno muških cvjetova varira s cvatnjom kultivarom i godinom (*Martin, 1996.).* Potpuno funkcionalanom cvijetu svjedoči njegov veliki tučak koji gotovo ispunjava prostor unutar cvijeta. Tučak je zelen kad je nezrel i tamno zelen kada je otvoren, odnosno u punom cvatu. Kod funkcionalno muških cvjetova tučci su sićušni, jedva se dižu iznad baze cvijeta. Tučak je malen, smeđi, zelenkasto-bijeli ili bijeli, a njuška tučka je velika i perasta kao što je to slučaj u potpuno funkcionalnom tučku (*Martin, 1996.).*

2.4.6. Plod

Stablo masline ima snažan dvogodišnji ciklus. Teško opterećenje stabla plodovima sprječava rast mladica koje su neophodne za stvaranje novih grana koje će donijeti plod sljedeće godine i obrnuto (*Van der Vossen i sur., 2007.).* Plod je koštunica s kožicom prekrivenom voštanom prevlakom nepropusnom za vodu. Maslina ima mesnu masu bogatu mastima pohranjenim tijekom lipogeneze od kraja kolovoza do pune zrelosti. Plod je prvo zelen (slika 8.), te postaje crn u punoj zrelosti (*Denninger i sur., 1993.).* Plodovi masline

sastoje se od tučka, a stijenka plodnice ima mesnate i suhe dijelove. Pokožica ploda (egzokarp) nema dlačice i sadrži puči. Mesnati dio (mezokarp) je jestivi dio, a endokarp okružuje košticu sa sjemenkom. Oblik i veličina ploda, veličina endokarpa i površinska morfologija uvelike variraju među kultivarima. Endokarp se povećava do pune veličine i otvrdnjava 6 tjedana nakon pune cvatnje, a mezokarp i egzokarp nastavljaju postepeni rast (*Martin,1996.*). Koštica se sastoji od omotača koji se ljeti (kraj srpnja) sklerotizira *(Barranco i sur., 1992.*) i sjemenke.

Prema klasifikaciji oblik ploda određen je odnosom dužine i širine te može biti (*Bottari i Spina, 1952.*):

- Sferičan do sferoidalan
- Jajast do cilindričan
- Cilindričan do izdužen



Slika 8. Plodovi masline na početku prerade (Foto: Frančišković, 2014.)

Plod masline je prekriven voštanom prevlakom. Boja ploda mijenja se dozrijavanjem od početne zelene boje do krajnje tamnije crveno-ljubičaste i crne boje. 75-85% ukupne mase ploda čini meso ploda, a 15-30% je ulje. Endokarp (koštica) čini 13-23% mase ploda, to je drvenasta ljuska u kojoj se nalazi sjemenka (*Bottari i Spina, 1952*).

Oblik koštice (*Bottari i Spina, 1952*.):

- Izdužen
- Eliptičan
- Jajast

Prema veličini ploda (*Bottari i Spina, 1952*) klasificiraju maslinu na sljedeće kategorije:

- Sitni plodovi (450 do 600 plodova u 1kg)
- Srednje krupni plodovi (300 do 450 plodova u 1kg)
- Krupni plodovi (od 100 do 300 plodova u 1kg)

2.5. Ekologija masline

Područje rasprostranjenosti masline limitirano je u prvom redu klimom. Pošto geografska širina suštinski utječe na klimu, maslina se uspješno uzgaja u pojasu od 25-46° sjeverne geografske širine. Kako je maslina dugogodišnja zimzelena biljka, ona ima i posebne zahtjeve za pravilnim odabirom staništa. Jedna stara talijanska poslovica kaže: maslina uspijeva tamo gdje su osigurani ovi uvjeti: sunce, suša, samoća, kamen i mir. Na talijanskom to su 5 riječi koje počinju sa slovom S (sole, siccita, solitudine, sasso, silenzio).

Olea Europaea razvila je niz prilagodljivih mehanizama za preživljavanje pri dugotrajnim ljetnim uvjetima na mediteranskom području, koji utječu na količinu vode i asimilaciju CO_2 (*Moreno i sur., 1996*), (*Gucci i sur., 1997*.). Maslina je vrlo izdržljiva i ravnodušna prema tlu. Osjetljiva je na vlagu i jake vjetrove (*Terral, 1997*.).

2.5.1. Klima

Klima nekog kraja je skup atmosferskih stanja u toku dugog vremenskog razdoblja (najmanje 30 godina). Za život i plodonošenje masline značajni su sljedeći klimatski elementi: svjetlost, toplina, voda, vlažnost i vjetar.

Svjetlost - sunčeva svjetlost je pokretač života na zemlji. Maslina je biljka sunca. Svjetlost je izvor energije za fotosintezu i izvor topline za normalan tok drugih životnih procesa. Svjetlost je bitan čimbenik opstanka, rasta, razvitka masline kao i kvalitete njenih plodova. Sunčeva svjetlost dopire na razna mjesta na zemljinoj površini u različitim količinama.
To zavisi od geografske širine, nadmorske visine, položaja, nagiba, vremenskih prilika u toku dana i godine, blizina planina, šuma, velikih vodenih površina, visokih zgrada, pravca tijekom sadnje, gustoće sadnje, sistem i oblik krošnje, način održavanja zemljišta.

Najbolje su osunčani južni položaji, a najmanje sjeverni. U uvalama i dolinama u blizini planina, velikih šuma i visokih zgrada, kao i na većim nadmorskih visinama može se javiti nedostatak svjetlosti i topline.

Toplina - je kao i svjetlost važan čimbenik za uspjeh masline. Toplina je bitna kod fotosinteze i drugih životnih procesa masline. Toplina i nasljedna osnova masline određuju početak, tok i završetak svih fenofaza masline: kretanje, listanje, cvjetanje, oprašivanje, oplodnja cvjetnih pupoljaka, kao i prividno zimsko mirovanje.

Maslina uspijeva točno u određenim toplinskim uvjetima.

Prema Azzi-u (*1941, 1952.*) limitirajuće temperature u pojedinim fazama godišnjeg biološkog ciklusa masline su sljedeće:

1. Resanje i cvjetanje 10°C
2. Početak cvjetanja i oplodnje 15°C
3. Od zametanja ploda do izmjene boje ploda (šarak) 20°C
4. Od promjene boje do potpune zrelosti 15°C
5. Završetak zriobe do kraja berbe 5°C
6. Od kraja berbe do pojave cvata (resa) 5°C

U toku druge filogeneze masline, formirane su ekološke grupe maslina koje su vrlo različite po nizu fizioloških faktora. Maslina najbolje uspijeva kod srednje godišnje temperature od 16 do 20℃. Može podnijeti maksimalne temperature i do 50℃ (slika 9.). Niske temperature na kojima maslina stradava zavise od niza faktora i kreću se do -15℃.



Slika 9. Ožegotine na deblu masline (Izvor: Internet)

Faktori koji utječu na izdržljivost masline prema niskim temperaturama su sljedeće: trajanje niskih temperatura, fiziološko stanje biljke, stadij vegetacije, rodnost, kompleks

ambijentalnog faktora, uzgojni oblik, geografski položaj. Kritične temperature su ako je -7 do -8°C u trajanju dužem od 8-10 dana.

Voda - maslina se uglavnom kao i druge voćke vodom snabdijeva iz zemljišta. Od ukupne usisane vode, za izgradnju tkiva i organa, troši od 0.1 do 0.3%, a ostalo ispari putem transpiracije. Optimalna relativna vlažnost zraka za uspješno uzgajanje masline kreće se od 60 do 70%.

Vjetar – obično se predstavlja kao negativni čimbenik, međutim za maslinu ima veliki značaj, jer je maslina anemofilna biljka. Njegov utjecaj ovisi od jačine, pravca i učestalosti, kao i od fiziološkog stanja masline u trenutku pojave. Vjetar isušuje zemljište i zrak, pojačava transpiraciju, pojačava utjecaj mraza, deformira oblik krošnje, potpomaže širenju štetnika, onemogućava zaštitu od bolesti i štetnika, pojačava eroziju. Pustinjski vjetrovi su negativni u vrijeme cvjetanja i oplodnje masline jer isušuju tučak cvijeta, ali lagani vjetrovi su povoljni za oplodnju i za sprječavanje gljivičnih oboljenja. Dobro izabran položaj za podizanje maslinika treba biti zaklonjen od jakih vjetrova. Ovo se može ublažiti sa vjetrobranskim pojasom i pravilnim pravcem sadnje. Idealni pravac je sjever-jug, kada se postiže najveća osvijetljenost i najmanji utjecaj vjetra.

Zemljište - za razliku od većine voćnih vrsta, maslina ima vrlo skromne zahtjeve prema zemljištu. Ovu poznatu činjenicu potvrđuju i naša istraživanja jer su zemljišta na kojima se maslina uzgaja različiti tipovi, ali pretežno plitka i siromašna.

Maslina može uspijevati na veoma različitim zemljištima, čak i na takvim koja nisu pogodna za većinu poljoprivrednih kultura. Prinos i kvaliteta ploda kod stolnih sorata zavisi o osobini zemljišta. U prilog ovome govori i kvaliteta ulja i količina koja se dobije od masline iste sorte, ali sa različitih područja. Maslina uspijeva na zemljištima različitih geoloških formacija. U Italiji ona daje dobre prinose kako na porfiritnom i kvarcnom, tako i na silikatno-glinovitim zemljištu bogatom manganom i željezom. Tereni vulkanskog podrijetla daju naročito kvalitetna ulja. Na svježim, dubokim i plodnim zemljištima ostacima aluvijima pored većih rijeka, maslina ima bujnu vegetaciju i daje visoke prinose, ali je ulje slabije kvalitete. Ovakva zemljišta se preporučuju za sadnju stolnih sorti. Zaslanjenim tlima maslina je slabo prilagođena. Smatra se da je zemljište dobro osigurano ako ima: 4-5% humusa, 10-15% fosfora i 15-30% kalija.

Međutim postoje i mnoga druga gledanja koja se zasnivaju na iskustvu, jer pokazalo se da maslina i druge biljke mogu dugi niz godina uspijevati i dati dobre i kvalitetne prinose na

zemljištima sa mnogo nižim sadržajima ovih elemenata. Od značaja su također i fizička, naročito toplinska svojstva zemljišta. Pješčana zemljišta se lako zagrijavaju ali i lako otpuštaju toplinu, a glinovita obrnuto. Boja zemljišta također ima određeni utjecaj. Na zemljištima otvorenije boje maslina je bolje bujnosti, ali i dobro rađa, dok na zatvorenijim bojama slabije.

Za suvremene nasade masline pogodni tereni su oni s blagim nagibom bez jaruga i izraženog reljefa, na kojima se lakše izvode radovi. Suviše strmi tereni nisu pogodni za primjenu mehanizacije a uz to su podložni i eroziji (25% nagiba je maksimum).

2.5.2. Reljef (orografija)

Pri odabiru mjesta za podizanje maslinika treba posvetit pažnju orografskim i drugim abiotskim čimbenicima sredine. Kao što su geografska širina, nadmorska visina, položaj, nagib terena, kao i blizina velikih vodenih površina.

Geografska širina tj. udaljenost od ekvatora je presudan čimbenik klime. Geografska širina utječe na dužinu vegetacijskog perioda, temperature zraka i zemljišta, osunčavanje, padaline.

Mjesta na velikim nadmorskim visinama nisu pogona za maslinu zbog opasnosti od snježnih padalina i jakih vjetrova. Položaji terena prema stranama svijeta utječu na osvijetljenost, temperaturu i vlažnost sredine. Najbolje osvijetljeni, najtopliji i najsušiji su južni položaji, dok su sjeverni hladniji, najvlažniji i najmanje osvijetljeni.

Za intenzivnu proizvodnju masline pogodni su tereni sa blagim padom od 3 do 5°, pri čemu na čitavoj površini treba postojati pad bez ulegnuća.

2.6. Proizvodnja masline

Maslina se uzgaja najviše na mediteranu oko 98%, ali posljednjih godina veliki je trend širenja, odnosno podizanja maslinika i na ostalim kontinentima. Maslina se uzgaja više od 4 000 godina. Tijekom uzgoja dosta se radilo i na selekciji. Selekcijom se težilo dobivanju krupnijih plodova, boljem prinosu i redovitom rađanju.

2.6.1. Proizvodnja masline u Hrvatskoj

Hrvatska je rubno područje uzgoja masline, ona se kod nas uzgaja više od 200 godina. Gledano genetski, maslina je veoma stabilna biljna vrsta te je pretpostavka da su donešeni fenotipovi aklimatizirali na naše uzgojno područje i kao takve ih možemo i danas pronaći na terenu *(Drezga, 2013.).* Ove genotipove mi danas nazivamo autohtonim i udomaćenim sortama maline *(Drezga, 2013.).*

Nekolicina maslina (četvrtina) se nalazi na napuštenim dijelovima, a imamo oko 3 milijuna stabala. Njih 30% je proizvedeno biološki. Dok se ostatak nalazi na teško dostupnim terenima i napuštenim površinama. Najviše se nalazi na otocima, a ako se nalazi na sjevernijim dijelovima onda je u nižim nadmorskim visinama, a što je južnije raste na višim nadmorskim visinama (*Ministarstvo povratka i useljeništva, 2013*). Otoci na kojima preveladava su: Cres, Krk, Murter, Šolta, Brač, Hvar, Korčula, Lastovo, Mljet te Zadar i njegova okolica (*Ministarstvo povratka i useljeništva, 2013*.).

Popis poljoprivrede u Hrvatskoj koji je proveden 2003. godine evidentirao je ukupno 2.432.653 stabala i 2.020.699 rodnih stabala masline, a 2006. godini bilo ukupno 3.216.000 stabala maslina, od čega rodnih 2.382.000 (*DZS RH, 2007*.).

U Hrvatskoj je identificirana 31 autohtona sorta masline, a introducirane su 44 sorte, pri čemu je potrebno istaknuti kako nije obavljena potpuna identifikacija asortimana masline u Hrvatskoj. Oblica je naša najrasprostranjenija sorta masline. U našem asortimanu masline zastupljena je s oko 60% (*Miljković, 1991*.) do oko 80% (*Kovačević i Perici, 1994*.). Najraširenija introducirana sorta je talijanska sorta Leccino. Inače, u nacionalnu sortnu listu upisane su 32 sorte masline (*Zavod za sjemenarstvo i rasadničarstvo, 2007*.)

Maslina je jedina mediteranska voćna kultura koja u posljednjih desetak godina bilježi povećanje proizvodnih površina, porast prinosa (tablica 1.) i porast proizvodnje maslinovog ulja (tablica 2.)

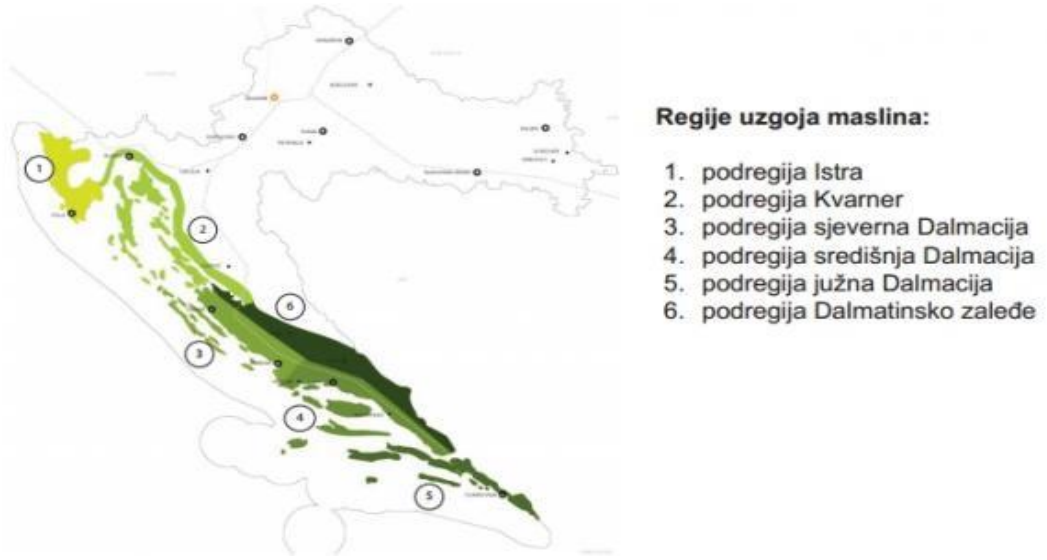
Tablica 1. *Intenzivna proizvodnja i maslina (za tržište), dzs rh (statistički ljetopis, 2016)*

	2011.	2012.	2013.	2014.
Površina, ha	17.200	18.100	18.590	19.082
Proizvodnja ukupno, t	31.423	50.945	34.269	8.840
Prirod po ha, t	1.8	2.8	1.8	0.5

Tablica 2. *Proizvodnja maslinova ulja, dzs rh (statistički ljetopis, 2016)*

	2006.	2007.	2008.	2009.	2010.	2011.	2012.	2013.	2014.	2015.
Maslinovo ulje, hl	45.652	57.790	57.665	53.735	52.055	50.000	55.000	50.000	10.640	35.352

2.6.2. Najzastupljenije sorte masline u Hrvatskoj



Slika 10. Razvojne regije masline (Izvor: Internet)

Podregija Istra

Istra je najsjevernija regija uzgoja masline (slika 10). Uzgaja se više od milijun stabala. Prevladava Buža i Istarska bjelica.

Najzastupljenije sorte: Buža, Istarska bjelica, Crnica, Rošinjolo, Oblica, Leccino, Frantoio.

Maslinari jako ulažu u prezentaciju i unapređenje vlastitih proizvoda, te već nekoliko godina ulaze u katalog ekstra djevičanskih maslinovih ulja svijeta *Flos Olei*.

Podregija Kvarner

Kvarner i Primorje je maslinarsko područje koje obuhavaća dio uz obalu a zajedno s njim tu spadaju i otoci Cres, Lošinj, Krk, Rab i Pag. Najviše stabala masline se nalazi na Cresu (slika 10.). Kao najčešća sorta pojavljuje se Oblica.

Ostale sorte: Plominka, Slivnjača, Rosulja, Drobnica.

Podregija Sjeverna Dalmacija

Ovo područje obuhavća sjeverni dio Dalmacije od Starigrada pa sve do otoka Ugljana, Pašmana, Silbe, Ista, Murtera i Dugog otoka. Ima negdje oko milijun stabala (slika 10.).
Najzastupljenije sorte: Oblica, Drobnica, Levantinka, Mastrinka, Karbunčela.

Podregija Srednja Dalmacija

Ova regija zauzima 40% uzgoja u Hrvatskoj. Najzastupljenija je proizvodnjom maslina. Samo na Braču ima oko milijun stabala (slika 10.).
Neke od sorta: Oblica, Drobnica, Levantinka, Lastovka.

Podregija Južna Dalmacija

Najzastupljenije sorte: Oblica, Lastovka, Drobnica .
Područje obuhvaća obalni dio od Ploča do rta Prevlake i otoke Lastovo, Mljet, Korčulu, Šipan, poluotok Pelješac (slika 10.).

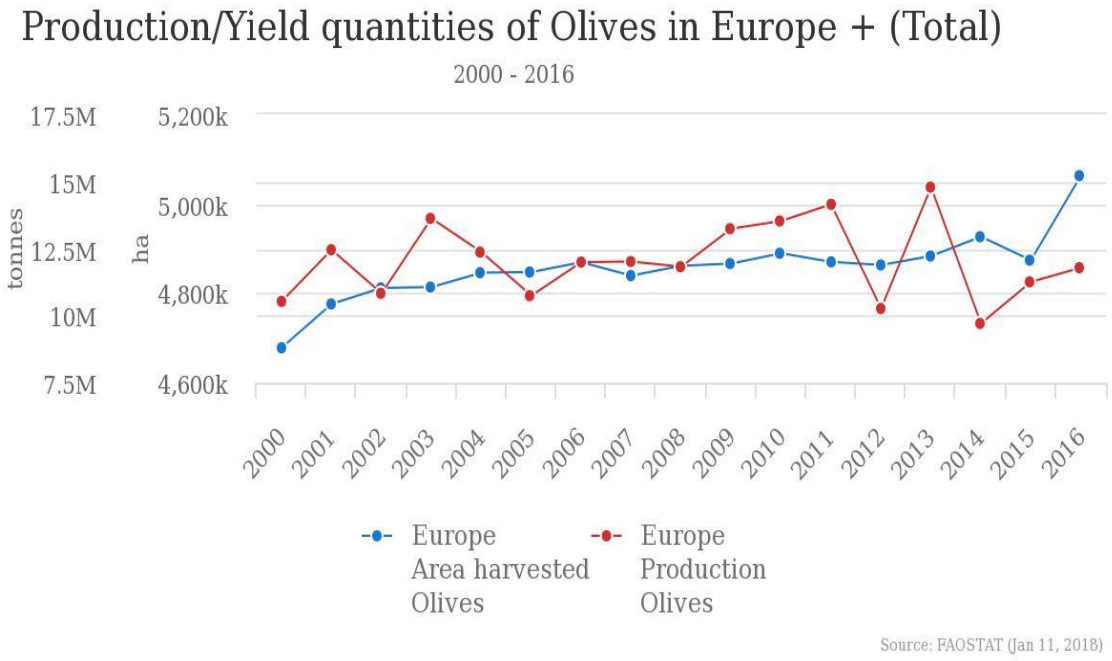
Podregija Dalmatinsko zaleđe

Pod unutrašnjosti se smatra sve u podnožju Velebita i Dinare, te na sjeveru brdskog planinskog masiva Kozjaka, Mosora i Biokova na jugu (slika 10.).
Sorte: Oblica, Istarska bjelica, Levatinka, Drobnica.

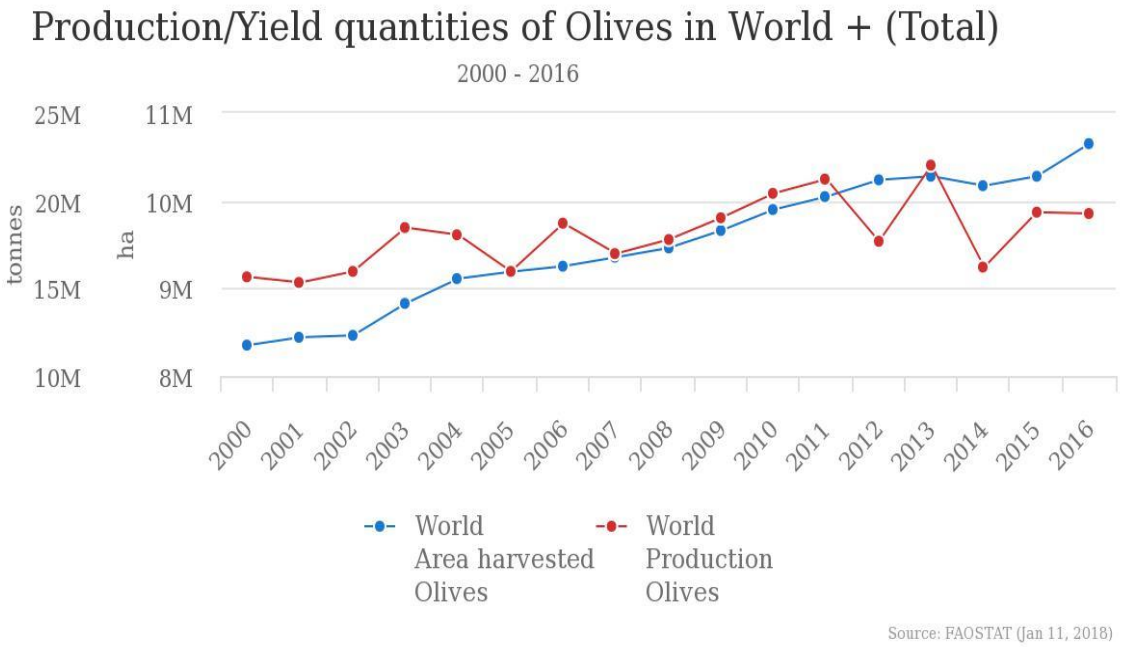
2.6.3. Proizvodnja masline u Europi i svijetu

Najveći proizvođači masline su: Španjolska, Italija, Grčka, Turska (grafikon 3.) po ukupnoj proizvodnji i po površinama. Makedonija se pojavila kao novi proizvođač masline, koja je 1998. podigla tek prve nasade na površini od 5 000 hektara.

2016. godina bilježi povećanje maslinika oko 5 100 hektara, a proizvodnja je dosegnula 12 000 tona maslina (grafikon 1.). Dok je 2013 godine proizvodnja masline dosegla je do 15 000 tona (grafikon 1.). Najmanje u Europi proizvodi Portugal (grafikon 3.).



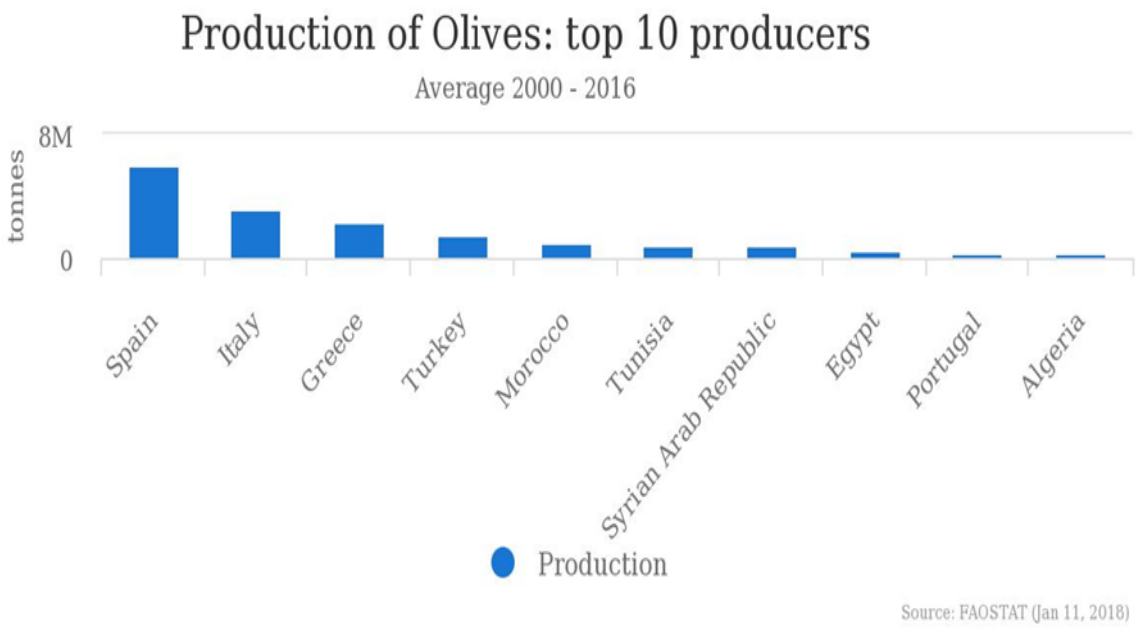
Grafikon 1. *Proizvodnja i prinos maslina u Europi (Izvor: Internet)*



Grafikon 2. *Proizvodnja i prinos maslina u svijetu (Izvor: Internet)*

Prema izvještaju FAO (Međunarodna organizacija za poljoprivredu i ishranu) u svjetskoj proizvodnji voća maslina zauzima peto mjesto u svijetu. Proizvodnja se kreće oko 19 tona na površini oko 2 400 000 hektara i prinosom od 1,86 t/ha (grafikon 2.). Europa je najjači kontinent po proizvodnji maslina oko 74,00%. Ako pričamo o zemljama proizvođačima na prvom mjestu je Španjolska (5 725 050 tona), Italija, Grčka, Turska, Sirija, Maroko i dr. zemlje (grafikon 3.)

.



Grafikon 3. *Prvih 10 proizvođača maslina (Izvor: Internet)*

2.7. Razmnožavanje masline

Masline kao i ostale biljke u prirodi, ramnožavaju se samostalno. Čovjek se iz ekonomskih interesa umiješano u ramnožavanje masline, pa ga je, koristeći njene biološke osobine stalno usavršavao. Sva dosadašnja saznanja i iskustva u razmnožavanju masline svode se na dva osnovna načina i to: razmnožavanje sjemenom i razmnožavanje djelovima masline. Kombinacijom ova dva načina i primjenom odgovarajuće tehnologije dobiva se sadni materijal kojim se podižu maslinici.

2.7.1. Generativno razmnožavanje

Generativan način razmnožavanja kod masline koristi se samo pri proizvodnji podloga. Sorte se na ovaj način ne mnogu umnožavati, obzirom da je maslina stranooplodna vrsta, kod koje se osobine matične biljke ne prenose vjerno na nove individue. Te nove biljke mogu biti slične ili vrlo različite uspoređene sa matičnom biljkom, jer predstavljaju potomstvo F1 generacije sorte, od koje je uzeto sjeme od oca nepoznatog podrijetla. Ovaj način razmnožavanja se danas koristi u oplemenjivanju masline kada se stvaraju nove sorte planskim križanjem ili hibridizacijom.

2.7.2. Vegetativno razmnožavanje

Vegetativno razmnožavanje ili multiplikacija je bazirano na mogućnosti stvaranja novih individua ili iz dijelova biljke, pod uvjetom da je moguće regenerirati nepostojeće dijelove ili preko spajanja podloge i plemke. Različite metode multiplikacije, direktno upotrebljivi kod masline, veoma su starog porijekla, vjerovatno su povezani s prvim iskustvima u kultiviranju ove vrste. Ipak, neki od njih, kao što je multiplikacija pomoću ovula, preko mladice ili odsječka grane, koji su danas označeni kao tradicionalni sistemi, vremenom su izgubili mnogo od praktičnog značaja, jer su zamijenjeni modernim tehnikama, kao što je kalemljenje sijanaca ili zelenih reznica. U nekim maslinarskim zemljama i dalje se koriste tradicionalni sistemi, bilo zbog njihove izuzetne jednostavnosti, bilo zbog drugih aspekata povezanih sa osobinama biljaka od kojih potječu.

Što se tiče tehnike kalemljenja koje je također najstarijeg podrijetla, vremenom je pretrpjela snažan razvoj postavivši moderna tehnika sa naglaskom na kalemljenju mlade sadnice sjemenskog podrijetla, što je odredilo nastanak i utemeljenje industrijskog rasadničarstva na kraju 20 stoljeća. Ova tehnika i dalje ostaje snažno raspostranjena, i pored tedencije da se njeno korištenje na industrijskom nivou smanji, zbog manualne

složenosti, neregularnosti rasta biljki koje se pomoću nje dobivaju i kasnog početka produkcije, ove nepogodnosti su djelomično razriješene upotrebom kloniranih podloga ili „čistih podloga“ koje su selekcionirane prema određenim osobinama. U nastavku će biti opisani razne metode multiplikacije direktnim putem.

Multiplikacija pomoću ovula (guka) - bazira se na korištenju guka (slika 11.), posebnih hiperplastičnih formacija, koje se spontano stvaraju u zoni korijenovog vrata i na bazalnom dijelu stabla odrasle biljke. Ovule se bogate latentnim pupoljcima i sadrže rezervne sastojke u dovoljnoj mjeri za ishranu poslije odvajanja, davajući mnogobrojne izdanke i korijenje, koje će se razviti u narednoj vegetativnoj sezoni. Oni se odstranjuju u periodu jesen-zima i ukopavaju u zemlju na oko 20-25 cm dubine. Metoda je multiaktivna za biljku-majku i ne dopušta visoku produkciju novih biljaka.



Slika 11. Guke masline (Izvor: Internet)

Razmnožavanje kalemljenjem - kalemljenjem se spajaju dva dijela iste ili različite voćke. (slika 12.) Spojeni dijelovi zadržavaju svoje biološke osobine, ali povezuju organe i tkiva fiziološkim funkcijama. Dio biljke koji se učvršćuje u zemlju naziva se podloga, a dio koji se kalemi na podlogu naziva se kalem grančica (plemka), a sadnica proizvedena na ovaj način zove se kalem ili dibios. Do nekad je ovaj način proizvodnje sadnica masline bio masovno korišten, a danas je u primjeni u izuzetnim prilikama i to ako se želi proizvesti sadnica sorte koja se slabo ožiljava iz zelenih reznica i kada se želi proizvesti sadnica za određene proizvodne uvjete (suša, zaslanjenost tla). Kalemljenjem se masovno proizvode

voćne sadnice željenih sorti podešavajući kombinacije podloge i sorte prema projektiranim sistemima uzgoja, oblika krošnje i agroekološkim uvjetima sredine.



Slika 12. Spajanje plemke i podloge (Izvor: Internet)

Razmnožavanje zelenim reznicama od lisnih grančica (mist propagation) - razmnožavanje masline reznicama od lisnih grančica predstavlja najmoderniji i najraprostranjeniji način proizvodnje sadnica u industrijskom rasadničarstvu. On omogućava uzimanje značajne količine materijala za razmnožavanje po jednoj matičnoj biljci. Ovaj način razmnožavanja masline je povezan sa posebnim sistemima koji omogućavaju rezniku da sačuva funkcionalnost aktivnost listova, tijekom čitavog procesa ukorijenjavanja. Tehnika razmnožavanja masline na ovaj način prvi put počela se koristiti u SAD-u i od tamo se proširila po čitavom svijetu pod nazivom Mist propagation ili nebulizacija. Za ovu namjenu su napravljeni posebni uređaji za ožiljavanje unutar staklenika. Pripremljene reznice se stavljaju na podlogu za ožiljavanje, obično sastavljenu od inertnog materijala. Dodava se voda sistemom za navodnavanje pomoću mikro-orošivača. Sistem je u stanju da održava povišene higrometrijske uvjete (supstrata i zraka) u okruženju reznica, preko povremenog otvaranja nebulizatora koji se regulira pomoću automatskih uređaja različitog tipa (fotoelektrična stanica, elektronska ploča, vaga, tajmer) za brzo i dobro ožiljavanje maslina potrebna je temperatura supstrata 22-24°C i određena količina hormonalnih supstanci posebno indol-butanol kiselina (IBA). Stalne promjene unutarnjeg nivoa vlažnosti prouzrokuje stresne uvjete, što se negativno odražava na proces ožiljavanja. Da bi se ove nepogodnosti djelomično izbjegle, sistem je modificiran

pokrivanjem cijele uzgojne površine tunelom od plastike. Ovime su relativno stabilizirani uvjeti, skratilo se vrijeme nebulizacije i smanjilo ispiranje listova i poboljšalo ožiljavanje. Pošto su se razvili korjenčići u nebulizatorima, reznice su se ukorijenile u grupe u plasteniku,te se presađuju u zemlju da bi kompletirale svoj rast u trajanju 2-3 godine.

2.7.3. Biotehnologija (mikropropagacija)

Biotehnološki proces, meristemsko razmnožavanje, kultura tkiva, kultura *in vitro* (*lat.* u staklu) predstavlja suvremenu metodu vegetativnog razmnožavanja.

Mikrorazmnožavanje ima niz prednosti:

- Pruža mogućnosti masovne proizvodnje sadnog materijala koji je oslobođen virusa
- Kulturom tkiva ostvaruju se nove mogućnosti oplemenjivanja masline
- Rijetke i dragocjene sorte mogu se sačuvati i razmnožavati

Postupak mikrorazmnožavanja zasniva se na sposobnosti biljnih stanica, tkiva i organa da rastu na umjetnoj hranjivoj podlozi (slika 13. i 14.) i da u sterilnim i kontrolirani uvjetima regeneriraju cijele biljke. Na ovoj metodi se dosta radi u Italiji, SAD-u i Izraelu, a posljednjih godina i u RH.



Slika 13. Eksplatanti na hranjivoj podlozi (Foto: Frančišković, 2017.)



Slika 14. Eksplantant masline (Foto: Frančšković, 2017.)

Danas je najviše u upotrebi podjela koju su dali *Debergh i Maene* (*1981*), koja podrazumijeva nekoliko međusobno različitih postupaka tj. faza.

Nulta faza - ova faza uključuje sve postupke prije početka kulture *in vitro*; pravilan postupak s početnim materijalom, njegovo čuvanje u zdravom stanju (staklenik bez kukaca, čiste posude, zalijevanje samo vodom, čuvanje biljaka u relativno suhim uvjetima, dobra zdravstvena zaštita itd). Ovaj korak značajno pridonosi uspjehu kasnijih faza. Izvorno biljno tkivo od kojega će biti uzeti eksplantati i postupak koji će se primijeniti imaju kritičnu ulogu u uspješnom postavljanju mikrokloniranja. Ako genetska stabilnost tkiva varira, tako će i tipovi tkiva eksplanata koji se upotrebljavaju za kulturu utjecati na varijabilnost reprodukcije. Vršni se meristem preporučuje u tome smislu jer pruža određenu sigurnost u odstranjivanju mikroorganizama, koji su izvor zaraze.

I. Faza inicijacije – formiranje lisnih rozeta, ova faza pokriva sterilnu izolaciju meristema, vegetacijskog vrška, eksplanta i dr. Najvažnije u ovoj fazi je dobivanje sterilnog rasta eksplantata. Faza inicijacije je najkritičnija faza tijekom koje eksplantati moraju prevladati

problema s gljivičnom i bakterijskom kontaminacijom (*CIDES, 1999*.), te inicirati proliferaciju pupova za koju auksinsko/citokininska ravnoteža u mediju igra ključnu ulogu (*Zuccherrelli i Zuccherrelli, 2003*.). Pupovi se uvode i kultiviraju u medijima koji sadržavaju različite komponente kako bi se osigurala njihova proliferacija. Najčešće korišteni hranjivi mediji za masline su *Murashige i Skoog* (1962) i Ruggini olive media (1984). Ovi mediji često su obogaćeni vitaminima i regulatorima rasta (*Sakunasingh i sur., 2004.*). Uvedeni eksplanat može biti aksilarni ili apikalni pupoljak (*Zryd, 1988*.). Kultura maslina „*in vitro*" zahtijeva fotoperiodizam od 16h s intenzitetom svjetlosti od 4 000 lux (*Abousalim i sur., 2004*.). Trajanje faza ovisi o genotipu i vremenu uzorkovanja biljnog materijala (*Techniver, 2007*.)

II. Faza multiplikacije – umnožavanje izdanaka (razvoj novih izdanaka iz bočnih i adventivnih pupoljaka. To je faza razmnožavanja (multiplikacije). Glavna je svrha ove faze postići razmnožavanje bez gubitka genetske stabilnosti. Ova se faza sastoji od presađivanja dobivenih izdanaka iz faze inicijacije. Tijekom ove faze povećava se broj biljaka. Umnožavanje se obavlja na različite načine. Koji će način biti upotrijebljen ovisit će o svakom specifičnom slučaju, o biološkim ograničenjima vrste, o faktoru umnožavanja potrebnom za dobivanje željenog broja biljaka i posebnih značajki ili potrebe određenog klona uvjetovanih genotipom. Od formiranog izduženog izdanka izoliraju se nodijalni segmenti i uzgoje se na podlozi za umnožavanje. Stopa umnožavanja u ovoj fazi je različita za različite biljne vrste i sa svakom narednom subkulturom broj aksilarnih izdanaka se povećava logaritamski. Tako se u toku godine broj izdanaka može povećati do milijunskih cifara. Upotrijebljeni medij često je identičan prvom, iako su moguće manje razlike u hormonskoj ravnoteži (auksin-citokinin) (*Zuccherrelli i Zuccherrelli, 2003*). U ovoj fazi multiplikacije u mediju se citokinini obično nalaze u većoj koncentraciji od auksina. To je s fiziološke točke gledišta zbog činjenice da citokinini vrše supresiju apikalne dominacije i potiču rast novih izdanaka/stabljika (*Cevie, 1997*). Tokom 4-8-12 tjedana prati se rast kulture u epruvetama i vrši umnožavanje. Tijekom ove faze koriste se neki od provjerenih medija poput MS, OM, WPM s dodavanjem određenih koncentracija citokininskih hormona poput BAP (6-benzilaminopurin) ili zeatina (*Abousalim i sur., 2004*.). Najprikladniji citokinin za mikropropagaciju masline je Zeatin *(Rugini, 1984; Mencuccini i sur., 1995.: Rokba i sur., 2000.)*

III. Faza elongacije – izduživanje izdanaka, uključuje pripremu izdanaka ili biljaka dobivenih u II. fazi za prijenos u tlo. To može uključivati: zaustavljanje stvaranja

aksilarnih izdanaka i/ili početak izduživanja izdanaka. Treba potaknuti stvaranje korijenja, bilo *in vitro* ili *in vivo*. Oblikovani se izdanci fizički odvajaju i pojedinačno prenose na podlogu za ukorjenjivanje. Podloge za indukciju korijena izrazito variraju i ovise o biljnoj vrsti za koju se upotrebljavaju. Izdanci vrsta koje se lako ukorjenjuju mogu se izravno prenijeti u supstrat/tlo i tako isključiti III fazu.

IV. Faza rizogeneze i aklimatizacije – ožiljavanja i aklimatizacije (formiranje korijena). Glavna razlika leži prvenstveno na hormonalnoj ravnoteži u korist auksina (*INRA, 1997*.). Mladi listovi i pupoljci su prirodna „staništa" auksina; slično tradicionalnim reznicama, ove sadnice će razviti korijenje same po sebi; dok neke vrste zahtijevaju dodavanje auksina kako bi se potaknulo korijenje. Ovaj auksin se često upotrebljava kao IBA ili NAA (*Chaari- Rkhis i sur., 2006.).* Nakon uklanjanja agara s baze, biljke se prenose u hortikulturni supstrat sastavljen prvenstveno od mješavine komposta i tla (*Techniver, 2007*.) ili smjesa vermikulit-perlit s omjerom 3: 1 (*Peixe i sur., 2007.),* a zatim se pokrivaju prozirnom folijom kako bi zadržali oko 100% relativne vlage. Zatim se vlažnost progresivno smanjuje tijekom faze aklimatizacije biljnog materijala. Listovi biljaka uzgojenih *in vitro* često su vrlo tanki i nježni te se ne mogu dovoljno fotosintetizirati. Puči ne funkcioniraju normalno; najčešće su otvorene, što još pospješuje velik gubitak vode u prvim satima aklimatizacije. Biljke *in vitro* još su heterotrofne i moraju prijeći na fotoautotrofni način života nakon prijenosa u tlo što je za njih određeni stres. Biljke nastale *in vitro* moraju se pripremiti na prijenos u vanjske uvjete, što može početi već u uvjetima *in vitro*; ovi postupci se opisuju kao jačanje biljaka ili aklimatizacija. Aklimatizacijom se biljke postupno privikavaju na smanjenje relativne atmosferske vlažnosti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Cilj istraživanja i laboratorij za *in vitro*

Istraživanje s ciljem ispitivanja mogućnosti mikropropagacije (sterilizacije, sprječavanja fenolnog posmeđenja i proliferacije) eksplantata masline (*Olea europaea L.*) provedeno je u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva u sklopu Katedre za hortikulturu (labaratorij za voćarstvo) na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku (slika 15.).



Slika 15. Laboratorij na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku (Foto: Frančišković, 2016.)

U laboratoriju se pored standardne metode (kruti medij) koristi i suvremeni sustav bioreaktora (TIB/TIS sustav – tekući medij). Kroz ovaj model omogućena je proizvodnja velikog broja bezvirusnih voćnih sadnica u još kraćem vremenskom periodu ali i niz mogućnosti koje klasični sustav nema. Istraživanja se vrše na mnogim voćnim vrstama (malina, orah, borovnica, paulovnia, lijeska, vegetativne podloge za trešnju, višnja, itd). Katedra se prvenstveno bavi znanstvenim istraživanjem, odnosno komparacijom, razvijanjem i poboljšanjem protokola *in vitro* proizvodnje, analitičkim metodama u cilju edukacije studenata i razvoja oplemenjivačkog i selekcijskog rada u voćarstvu, proizvodnjom sadnog materijala i sekundarnih metabolita.

Labaratorij osim sve opreme potrebne za uspješno provođenje mikropropagacije (laminarni stol/kabinet, autoklav, mješalica, pH metar, sterilizator, pincete, skalpeli, teglice, itd) posjeduje i matični biljni materijal (matičnjak – prijavljen u centru za rasadničarstvo HCPHS). Matičnjak se nalazi u zaštićenom prostoru fakulteta, a isti prostor služi i u završnoj fazi mikropropagacije, odnosno za aklimatizaciju *in vitro* biljaka (slika 16). Također posjeduje i odvojenu prostoriju (klima komora) s policama u kojoj je moguća regulacija režima svjetlosti i temperature potrebne za pojedini biljni materijal koji je u fazi inicijacije, multiplikacije, elongacije ili ukorijenjavanja (slika 17.).



Slika 16. Matičnjak (Foto: Frančišković, 2017.)



Slika 17. Klima komora (Foto: Frančišković, 2017.)

3.2. Sortiment u pokusu

3.2.1. Oblica

U Hrvatskoj možemo je naći već 2 000 godina. Možemo je naći na svim otocima (Hvar, Vis, Krk, Cres, Korčula), kao i u Zadru, Splitu, Makarskoj te poluotocima Pelješcu i Istri. Plodovi joj dosežu do 6 grama (slika 18.). Sadržaj ulja u plodu je od oko 18.21% ovisno o području uzgoja. Otporna je na hladnoću, sušu, vjetar i rak masline. Možemo je i posaditi na plitkim i škrtim tlima.



Slika 18. Oblica (Foto: Frančišković, 2016.)

Nedostatak joj je alternativna rodnost, zbog toga što ima 40% funkcionalno muških cvjetova, i ima nisku mogućnost samooplodnje. Cvate u svibnju. Oprašivači koji joj odgovaraju su: Leccino, Pendolino, Picholine, Ascolana Tenera, Drobnica, Lastovka i Levantinka. Uvrštena na sortnu listu Republike Hrvatske, te je na popisu svjetskih sorta masline koji se vodi pri Međunarodnom vijeću za maslinovo ulje (COI) u Madridu.

3.2.2. Drobnica

Najčešće je možemo naći na Korčuli. Procjenjuju da ima oko 1 000 godina. Plod njen korisiti se isključivo za ulje. Plod je okrugao, izdužen, dno plitko, a vrh okruglasto, težina oko 2.18 grama (slika 19.). Ima bujan rast. Otpornost na zimu, sušu i vjetar. Osjetljiv je na paunovo oko. Koštica se teško odvaja od mesa. Količna ulja u plodu je oko 16-23%. Dobar je oprašivač za Lastovku, Oblicu i Dužicu. Spada u srednje ranu sortu pa je manja opasnost od pojave štetnika.



Slika 19. Drobnica (Izvor: Internet)

3.2.3. Rosinjola

Prevladava u Istri i Primorju te otocima. Plod joj je mali i simetričan, težina mu je oko 2.5 grama. Prepoznamo ga po jajolikastom obliku (slika 20.), a kada poprimi ljubičastu boju ima na sebi brojne pjegice. Uz primjenu agrotehnike rodnost je redovita i stalna. Oplodnju vrši sa domaćim sortama. Zbog krošnje koja je bujna treba paziti na pojavu gljive čađavice i napadu štitastih uši. Ulje je pikantnog okusa, umjerene gorčine i intezivnog mirisa.



Slika 20. Rosinjola (Izvor: Internet)

3.3. Medij (podloga) za uvođenje u kulturu tkiva i radni prostor

U istraživanju je korištena polukruta hranjiva podloga WPM (*Lloyd i McCown, 1980*) uz dodatak različitih koncentracija hormona. Koncentracije hormona biti će detaljno opisane u daljnjem tekstu pod poglavljem 3.5. tretmani u pokusu. Vrijednost pH podloge se prije autoklaviranja podesila na 5.8 ali treba uzeti u obzir da se ta vrijednost može promijeniti nakon autoklaviranja, kao i da sama biljka može utjecati na promjenu (*Vinterhalter i Vinterhalter, 1996*).

Ova hranljiva podloga imala je sljedeći sastav makro i mikro mineralnih soli, organskih i ostalih dodataka (dodatna sterilizacija i smanjenje fenolnog posmeđenja), (tablica 3.):

Tablica 3. *Sastav hranjive podloge WPM korištene u istraživanju*

Makro mineralne soli	(mg/l)	Mikro mineralne soli	(mg/l)	Organski i ostali dodatci	(mg/l)
$CaCl_2$	72.50	$MnSO_4 \times H_2O$	22,30	Agar	8000.00
$Ca(NO_3)_2$ x 4 H_2O	471.26	$ZnSO_4 \times 7H_2O$	8.60	Saharoza	30000.00
KH_2PO_4	170.00	H_2BO_3	6.20	Glicin	2.00
K_2SO_4	990.00	$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0.25	Myo-inositol	100.00
$MgSO_4$	180.54	$CuSO_4 \times 5H_2O$	0.25	Nikotinska kis.	0.50
NH_4NO_3	400.00	FeNaETDA	36.70	Piridoksin HCl	0.50
				Tiamin HCl	1.00
				PVP	100.00
				PPM	2ml

Navedena hranljiva podloga, ali i destilirana voda potrebna za hlađenje pribora sterilizirani su u autoklavu pri temperaturi od 121°C u trajanju od 20 minuta i tlaku od 1.2 bara. Ostali instrumenti, skalpeli, pincete, podloga za seciranje, petrijeve zdjelice, čaše također su sterilizirani autoklaviranjem u trajanju od 30 minuta na temperaturi od 121°C i tlaku od 1.2 bara. Radni prostor je tretiran UV lampom u trajanju od 2 sata dok je radna površina tretirana 95%-im alkoholom. Tijekom rada pribor je više puta mijenjan tj. vraćan u alkohol i steriliziran u sterilizatoru s kvarcnim kuglicama.

3.4. Sterilizacija i inicijacija početnog materijala (eksplantata)

Izvor eksplantata, odnosno baznog materijala potječe iz vanjskih uvjeta okoline (otok Krk, primorska Hrvatska, prikupljeno u listopadu/jesen 2017). S vodopija nastalih u tekućoj

vegetacijskoj sezoni (slika 21.), nakon što su donesene u labaratorij, vrlo oštrim skalpelom disecirani su nodijalni segmenti (eksplantati) na kojima se lateralno nalaze po dva aksilarna pupa u pazušcu lista, dužine oko 3 cm (slika 22.).



Slika 21. Vodoopija
(Foto: Frančišković, 2017.)



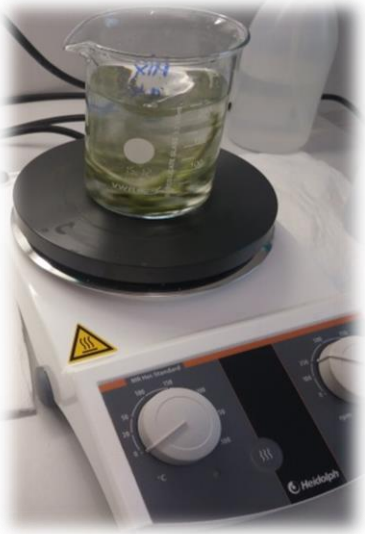
Slika 22. Eksplantant
(Foto: Frančišković, 2017.)

Nakon pažljivog uklanjanja listova, eksplantati su ispirani pod mlazom vode 2-3 minute. Da bi se smanjilo posmeđenje (oksidacija fenola), *Murashige* je preporučio umakanje eksplantata u otopine askorbinske i citrične kiseline i/ili dodavanje iste mješavine u pripremljeni medij.

U našem pokusu eksplantati si bili potopljeni u kombinaciju askorbinske i citrične kiseline (100mg/l) u kojoj su proveli 30 minuta. Nakon toga prebačeni su na vrlo kratko vrijeme od 1 minute u 70% etanol s ciljem istiskivanja mjehurića zraka oko eksplantata, odnosno boljeg prijanjanja i učinkovitosti narednih korištenih sterilizanata. Kao primarni sterilizant korišten je 10%/vv komercijalnog NaOCl (komercijani naziv - Cekina) uz dodatak par kapi Tween 80, a eksplantati su u njemu na magnetnoj mješalici proveli 10 minuta (slika 24). Kako bi dodatno uništili moguće ostatke egzo i endogenih patogena kao zadnji ili sekundarni sterilizant koristili smo odvojene kombinacije fungicida (10 minuta) i antibiotika (10 minuta) kako je navedeno u tablici 4.



Slika 23. Incijacija u epruvetama
(Foto: Frančišković, 2017.)



Slika 24. Eksplantanti na magnetnoj mješalici
(Foto: Frančišković, 2017.)

Nakon provedene sterilizacije eksplantati su pod laminarom isprani u 3 sterilne vode, te se pristupilo uvođenju istih u epruvete, odnosno prethodno pripremljeni medij. Inicijacija je obavljena u epruvetama koje su sadržavale po 10 ml hranljive podloge (slika 23).

Tablica 4. *Korištene kombinacije fungicida i antibiotika u sterilizaciji eksplantata*

Kombinacija fungicida	Koncentracija	Kombinacija antibiotika	Koncentracija
Folpet + Al. fosetil	3 g/l	Amoksicilin	0.1 g/l
Kaptan	2.5 g/l	Kasugamicin	1 ml/l

3.5. Tretmani u pokusu

U ovom istraživanju korištena su dva tretmana, odnosno dva različita hormona citokinina (COCO = kokosova voda + BAP 6-Benzylaminopurin; i GA3 = giberelinska kiselina + BAP 6-Benzylaminopurin) u indukciji proliferacije eksplantata masline s kombinacijom stavljanja eksplantata u mrak (COCO mrak i GA3 mrak) i bez mraka (COCO i GA3) kao jedna od metoda u sprječavanju oksidacije fenola.

***Tablica 5**. Sastav tretmana u pokusu*

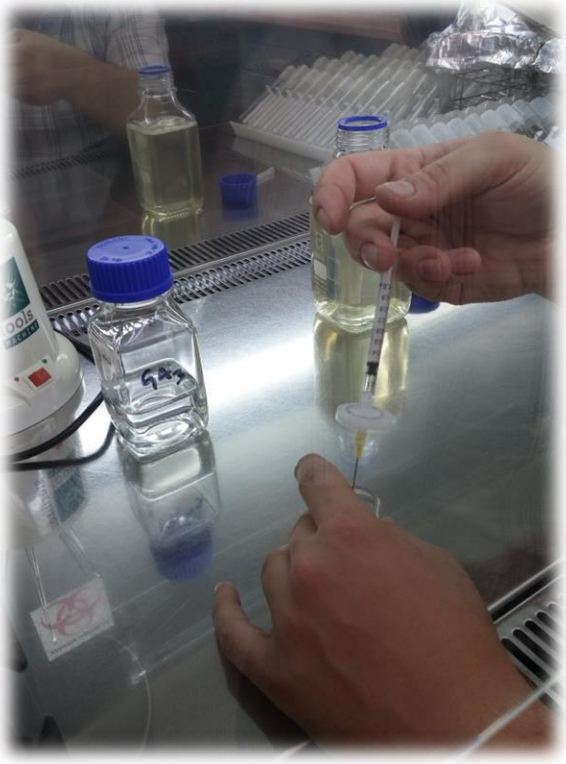
T1 - COCO	T2 – COCO mrak	T3 – GA3	T4 – GA3 mrak
WPM + org. i ostali dodatci	WPM + org. i ostali dodatci	WPM + org. i ostali dodatci	WPM + org. i ostali dodatci
BAP 0.5ml/l	BAP 0.5ml/l	BAP 2.1ml/l	BAP 2.1ml/l
Kokosova voda 50ml/l	Kokosova voda 50ml/l	GA_3 2.08ml/l (poslije autoklaviranja)	GA_3 2.08ml/l (poslije autoklaviranja)
pH 5.8	pH 5.8	pH 5.8	pH 5.8
10 eksplantata (bez mraka)	10 eksplantata (3 dana mraka)	10 eksplantata (bez mraka)	10 eksplantata (3 dana mraka)

Svaki tretman uključivao je prethodno opisan sastav mikro i makro soli WPM medija uz sve navedene organske i ostale dodatke u svrhu dodatne sterilizacije i smanjenja fenolnog posmeđenja (tablica 5.). Jedina razlika između tretmana bila je u izboru i sastavu hormona. Tako je tretman 1 (T1- COCO) sadržavao 0.5 ml/l hormona 6-Benzylaminopurina i 50 ml/l kokosove vode (slika 25), a tretman 2 (T2 - COCO mrak) istu kombinaciju hormona kao T1 ali su eksplantati bili u mraku 3 dana. Tretman 3 (T3 - GA3) sadržavao je 2.1 ml/l hormona 6-Benzylaminopurina i 2.08 ml/ l GA_3 giberelinske kiseline, a tretman 4 (T4 - GA3 mrak) istu kombinaciju hormona kao i T3 ali su eksplantati bili u mraku 3 dana. Napominjemo kako je giberelinska kiselina dodana nakon autoklaviranja preko hidrofilnog PTFE syringe filtera 0.2μm, odnosno kada se autoklavirani medij ohladio na <50°C pošto hormon nije termostabilan i pogodan za autoklaviranje (slika 26.). Svaki tretman uključivao je 10 epruveta, odnosno 10 eksplantata (ukupno 3 sorte x 10 epruveta x 4 tretmana = cjeli pokus 120 epruveta s eksplantatima).

Kod tretmana T2 i T4 nakon inicijacije na medij eksplantati su stavljeni u mrak na 3 dana, a nakon toga pod normalni režim svjetlosti. Stavljanje eksplantata u mrak predstavlja jednu od dodatnih metoda sprječavanja fenolne oksidacije ili posmeđenja. Primarna korištena metoda sprječavanja fenolnog posmeđenja predstavlja umakanju eksplantata opisano tijekom faze sterilizacije u mješavinu askorbinske i citrične kiseline, te naknadno dodavanje polyvinyl pyrrolidone (PVP) u medij. PVP predstavlja sredstvo koje se u kulturi tkiva koristi za adsorpciju štetnih fenolnih komponenata u mediju, kao što je slučaj npr. kod uporabe aktivnog ugljena.



Slika 25. Tretman 1 (BAP+ COCO)
(Foto: Frančišković, 2017.)



Slika 26. Dodavanje giberelinske kiseline nakon autoklaviranja
(Foto: Frančišković, 2017.)

3.6. Mjerenja u pokusu

Nakon 15 dana stabilizacije izmjerena je stopa kontaminacije, odnosno prebrojani su svi kontaminirani uzorci te je utvrđeno kod kojih je tretmana došlo do pojave posmeđenja ili oksidacije fenolnih spojeva (posmeđenje medija). Svi kontaminirani eksplantati su izuzeti iz daljnjeg tijeka istraživanja. Nakon ukupno 30 dana pristupilo se konačnom utvrđivanju proliferacije, posmeđenja i broja neživih eksplantata.

3.7. Obrada podataka

Svi utvrđeni rezultati su analizirani uobičajenim metodama statističke obrade podataka pomoću SAS Software 9.3, programske podrške (2002.-2010., SAS Institute Inc., Cary, USA) i Microsoft Office Excell 2010. Korištene su slijedeće statističke metode: analiza

varijance (ANOVA), statistički testovi značajnosti utjecaja primijenjenih tretmana – F test i Fisher's LSD test (*eng.* Least Significant Difference) pri razini vrijednosti od $p \leq 0.05$.

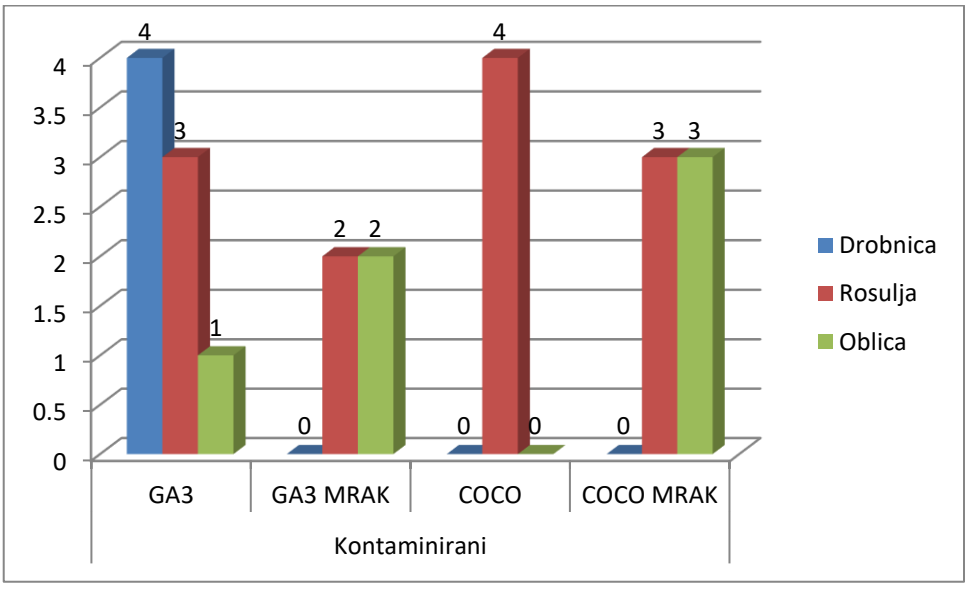
4. REZULTATI

4.1. Kontaminacija nakon 15 dana

Prema dobivenim rezultatima o kontaminaciji nakon 15 dana (grafikon 4.) gledajući ukupno bez obzira na primijenjene tretmane kultivara Drobnica je rezultirao najmanjim brojem kontaminiranih eksplantatat (4 eksplantata od ukupno 40 = T3-GA3).

Kultivar Oblica rezultirao je s ukupno 6 kontaminiranih eksplantata sveukupno. Pri tretmanu T2-COCOmrak rezultirao je najvećim brojem kontaminacije od 3 eksplantata, dok je kontaminacija na tretmanima T3-GA3 i T4-GA3mrak iznosila 1 i 2 eksplantata. Jedino na tretmanu T1-COCO nije došlo do pojave kontaminiranih eksplantata.

Kultivar Rosulja, ispoljio je najveći broj kontaminiranih eksplantata (12 eksplantata od 40) u odnosu na sve ostale kultivare. Na tretmanu T1-COCO zabilježena je najveća kontaminacija (4 od 10 eksplantata) dok se je i na ostalim tretmanima kretala u rasponu od 2 (T4-GA3mrak) do 3 (T3-GA3 i T2-COCOmrak) eksplantata.

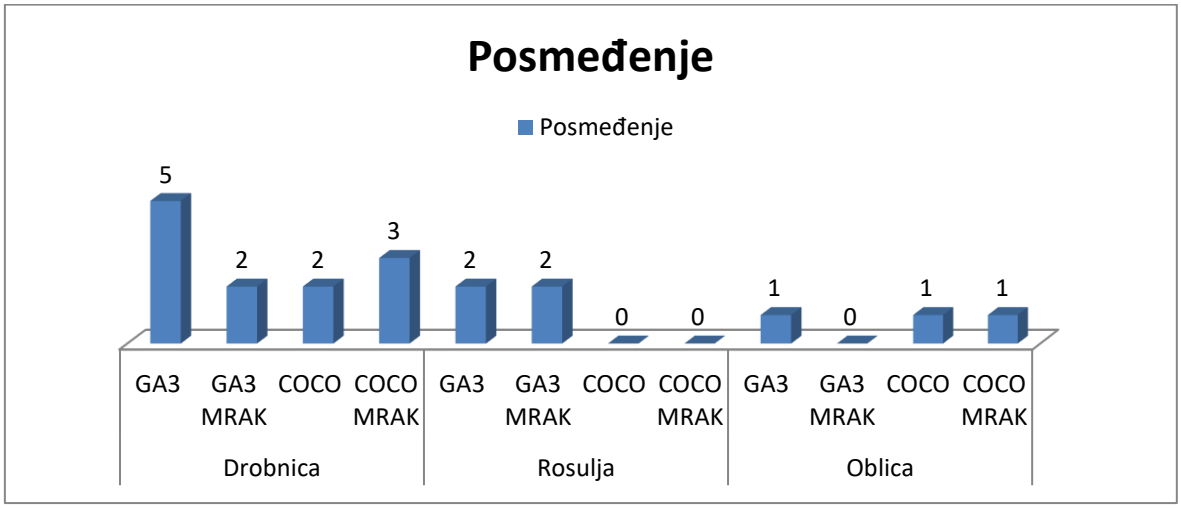


Grafikon 4. *Kontaminacija nakon 15 dana*

4.2. Posmeđenje nakon 15 dana

Nakon 15 dana stabilizacije eksplantata na mediju zabilježeni su sljedeći rezultati fenolnog posmeđenja (grafikon 5). Kultivar Drobnica rezultirao je najvećim brojem eksplantata s fenolnim posmeđenjem (12 eksplantata). Najveći broj zabilježen je pri tretmanu T3-GA3 (5 eksplantata), dok je tretman T2-COCOmrak ispoljio ovu negativnu pojavu na 3 eksplantata, a tretmani T1-COCO i T4-GA3mrak na 2 eksplantata.

Kultivar Rosulja nije ispoljio posmeđenje pri tretmanima T1-COCO i T2-COCOmrak, dok je pri tretmanima T3-GA3 i T4-GA3mrak zabilježena pojava na samo 2 eksplantata. Ukupno kod Rosulje je zabilježeno 4 eksplantatat s fenolnim posmeđenjem.

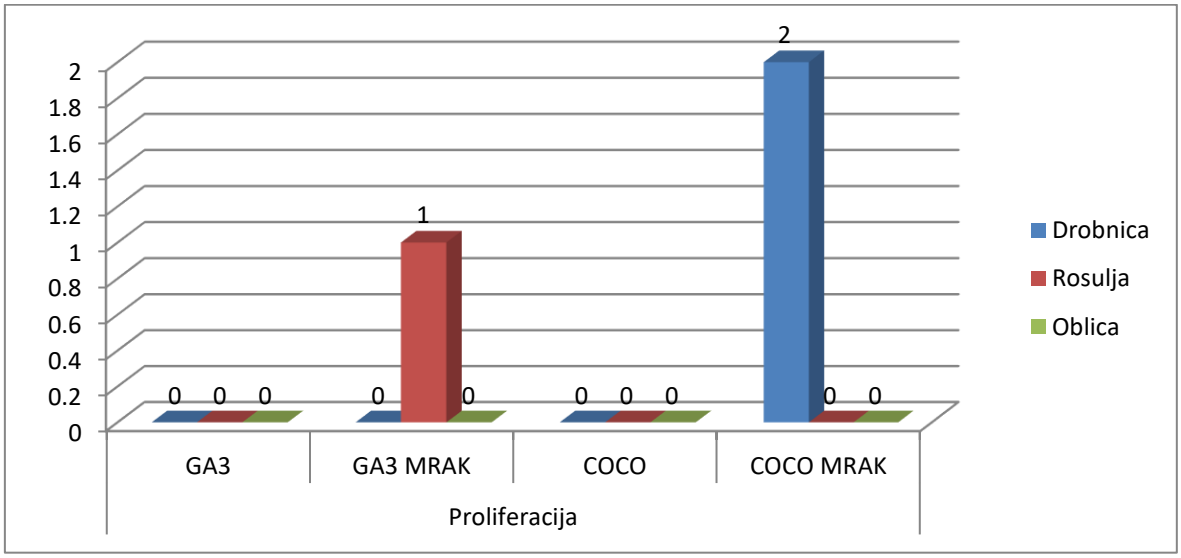


Grafikon 5. *Posmeđenje nakon 15 dana*

Na kultivaru Oblica svi tretmani osim tretmana T4-GA3mrak rezultirali su ovom negativnom pojavom ali u malom omjeru od svega 1 eksplantat po svakom tretmanu. Ovaj kultivar rezultirao je najmanjim brojem eksplantata (3) kod kojih je zabilježeno fenolno posmeđenje medija.

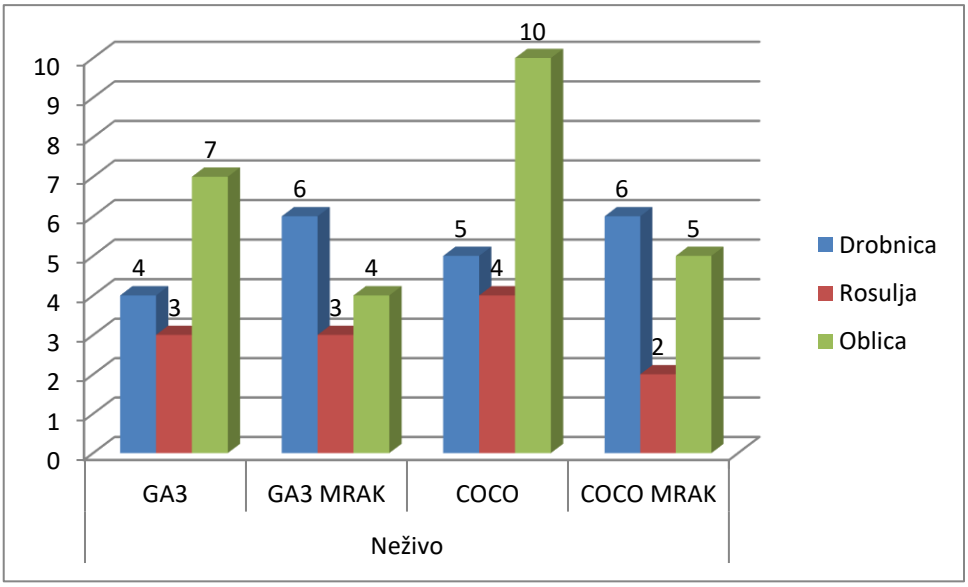
4.3. Proliferacija nakon 30 dana po sortama

Kako je vidljivo iz grafikona 6 jedino je kultivar Drobnica i kultivar Rosulja inducirao proliferaciju koja je bila vrlo slaba. Samo su 2 eksplantata kod kultivara Drobnica uspjela inicirati vegetativnu masu i to pri tretmanu T2-COCOmrak, a kultivar Rosulja jedan eksplantat pri tretmanu T4-GA3mrak.



***Grafikon 6**. Proliferacija nakon 30 dana*

4.4. Mortalitet eksplantata nako 30 dana stabilizacije



***Grafikon 7**. Mortalitet ekspantata nakon 30 dana*

Na razini cijelog pokusa zabilježena je vrlo velika stopa mortaliteta eksplantata nakon 30 dana prevedenih na mediju za indukciju proliferacije (Grafikon 7). Kultivar Oblica rezultirao je s najvećim brojem odumrlih eksplantata (26 eksplantata = 68%), kultivar Drobnica s 21 neživim eksplantatom (53%), a kultivar Rosulja s 12 neživih eksplantata (30%).

5. RASPRAVA

5.1. Razlike na razini cijelog pokusa

Na razini cijelog pokusa zabilježena je vrlo značajna razlika između primijenjenih tretmana, sorte i interakcije sorta x tretman (tablica 6). Kultivar Rosulja je rezultirao značajno većim brojem kontaminiranih eksplantata (3.00^{A}) u odnosu na sve ostale kultivare između kojih nije bilo razlike. Značajno veće fenolno posmeđenje u odnosu na sve ostale kultivare zabilježeno je kod kultivara Drobnica (3.00^{A}). Posmeđenje je rezultat oksidacije fenolnih spojeva, oslobođenih kroz površinu (otvorena rana) presjeka eksplanata – polifenoloksidaza (*Mayer and Harel 1979*), peroksidaza (*Loomis and Battaile 1966; Vaughn and Duke 1984*) ili zrak (*Robinson 1983*). Produkti oksidacije - kinoni, poznati su kao visoko reaktivni spojevi, odnosno kočnice enzimatske aktivnosti koja dovodi do smrti eksplanata (*Hu i Wang 1983*). Što se tiče broja neživih eksplantata, najveći mortalitet ispoljio je kultivar Oblica (6.50^{A}) koji je bio značajno veći u odnosu na sve ostale kultivare. Najmanji mortalitet dobiven je kod kultivara Rosulja (3.00^{C}) koji je bio značajno manji u odnosu na ostale kultivare u istraživanju.

Najveća kontaminacija zabilježena je pri tretmanu T3-GA3 (2.67^{A}) koja je bila značajna u odnosu na tretmane T1 (1.56^{B}) i T4 (1.44^{B}). Također i posmeđenje na tretmanu T3-GA3 (2.67^{A}) bilo je najznačajnije u odnosu na sve ostale tretmane između kojih nije bilo razlike. Najveći mortalitet zabilježen je na tretmanu T1-COCO (6.33^{A}) koji je bio značajniji u odnosu na sve ostale tretmane.

Tablica 6. *Statističke razlike na razini cijelog pokusa između kultivara, tretmana i interakcija kultivar x tretman za promatrane parametre kontaminacija, posmeđenje i mortalitet eksplantata.*

Kultivar	**Kontaminirani**	**Posmeđenje**	**Neživi**
Drobnica	1.25^{B}	3.00^{A}	5.25^{B}
Rosulja	3.00^{A}	1.17^{B}	3.00^{C}
Oblica	1.58^{B}	0.83^{B}	6.50^{A}
F-test	13.32	19.60	41.18
p	*0.0001*	*<.0001*	*<.0001*
Tretman	**Kontaminirani**	**Posmeđenje**	**Neživi**
T1-COCO	1.56^{B}	1.11^{B}	6.33^{A}
T2-COCOmrak	2.11^{AB}	1.44^{B}	4.33^{B}
T3-GA3	2.67^{A}	2.67^{A}	4.67^{B}
T4-GA3mrak	1.44^{B}	1.44^{B}	4.33^{B}
F-test	3.67	5.07	9.00
p	*0.0263*	*0.0074*	*0.0004*
Interakcija sorta x tretman			
F-test	*8.56*	*2.93*	*9.55*
p	*<.0001*	*0.0272*	*<.0001*

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

5.2. Razlike između primijenjenih tretmana po kultivarima

5.2.1. Drobnica

Značajno veća kontaminacija (4.00^{A}) i fenolno posmeđenje (5.00^{A}) eksplantata zabilježeno je pri tretmanu T3-GA3 (4.00^{A}) (Slika 27a i b). Između ostalih tretmana nije zabilježena značajna razlika u kontaminaciji i posmeđenju.

Tretmani koji su uključivali držanje eksplantata 3 dana u mraku (T2-GA3mrak i T4-COCOmrak = 6.00^{A}) rezultirali su najvećim brojem neživih eksplantata koji je bio značajno veći u odnosu na tretman T3-GA3 (tablica 7.).

Pojedine metode koje se koriste u supresiji i izbjegavanju nakupljanja štetnih toksičnih tvari u mediju uključuju: izbor novih mladih izdanaka *(Bon i sur 1988.)* stavljanje kulture u tamu (*Cassels and Minas 1983*), učestalo premještanje (subkultivacija) na svježi medij (*Broome and Zimmerman 1978; Lloyd and McCown 1980*), kultura na tekućem mediju (*Ishii et al. 1979*), aplikacija antioksidanata u medij i/ili potapanje (uranjanje) eksplantata u otopinu koja sadrži antioksidante prije inokulacije (*Gupta i sur., 1980; Vieitez i sur 1980; Ziv i Halevy, 1983*), upotreba sredstava za adsorpciju: aktivni ugljen, polivinilpirolidon, itd. (*Weatherhead et al., 1978, Gupta i sur., 1980)*, te izbor medija s niskom razinom soli i odgovarajućim regulatorom rasta (*Lloyd i McCown 1980; Hildebrandt i Harney 1988)*.

Tablica 7. *Statističke razlike između primijenjenjih tretmana na kultivaru Drobnica u kontaminaciji, posmeđenju i mortalitetu eksplantata*

Drobnica	Kontaminirani	Posmeđenje	Neživi
T1-COCO	0.33^{B}	2.00^{B}	5.00^{AB}
T2-COCOmrak	0.33^{B}	3.00^{B}	6.00^{A}
T3-GA3	4.00^{A}	5.00^{A}	4.00^{B}
T4-GA3mrak	0.33^{B}	2.00^{B}	6.00^{A}
F-test	*20.17*	*6.00*	*2.75*
p	*0.0004*	*0.0191*	*0.1123*

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



a) Kontaminacija b) Posmeđenje c) Proliferacija

Slika 27. Kontaminacija, fenolno posmeđenje i proliferacija Drobnice
(Foto: Frančišković, 2018.)

Kultivar Drobnica rezultirao je s proliferacijom na samo 2 eksplantata i to jedino pri tretmanu T2-COCOmrak. Na eksplantatima su se vidljivo razvili listići iz oba pupa (slika 27.)

5.2.2. Rosulja

Kod kultivara Rosulja, razlika u broju kontaminiranih eksplantata zabilježena je samo između tretmana T1 (slika 28a) i T4, odnosno tretman T1-COCO (4.00^{A}) rezultirao je značajno većim brojem kontaminiranih u odnosu na tretman T4-GA3mrak (2.00^{B}). Između ostalih tretmana nije bilo značajne razlike u kontaminaciji (tablica 8). Fenolno posmeđenje na tretmanima T3-GA3 (2.00^{A}) i T4-GA3mrak (2.00^{A}) značajno je veće u odnosu na sve ostale tretmane (slika 28b).

Značajna razlika u mortalitetu eksplantata zabilježena je samo između tretmana T1-COCO i T2-COCOmrak, odnosno Tretman T1-COCO (4.00^{A}) rezultirao je značajno većim mortalitetom u odnosu na tretman T2-COCOmrak (2.00^{B}).

Tablica 8. *Statističke razlike između primijenjenjih tretmana na kultivaru Rosulja u kontaminaciji, posmeđenju i mortalitetu eksplantata*

Rosulja	Kontaminirani	Posmeđenje	Neživi
T1-COCO	4.00^{A}	0.33^{B}	4.00^{A}
T2-COCOmrak	3.00^{AB}	0.33^{B}	2.00^{B}
T3-GA3	3.00^{AB}	2.00^{A}	3.00^{AB}
T4-GA3mrak	2.00^{B}	2.00^{A}	3.00^{AB}
F-test	*2.00*	*4.17*	*2.00*
p	*0.1927*	*0.0473*	*0.1927*

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



a) Kontaminacija b) Posmeđenje c) Proliferacija

Slika 28. Kontaminacija, posmeđenje i proliferacija Rosulje

(Foto: Frančišković, 2018.)

I kultivar Rosulja inducirao je proliferaciju ali samo jednog eksplantata i to pri tretmanu T4-GA3mrak (slika 28c).

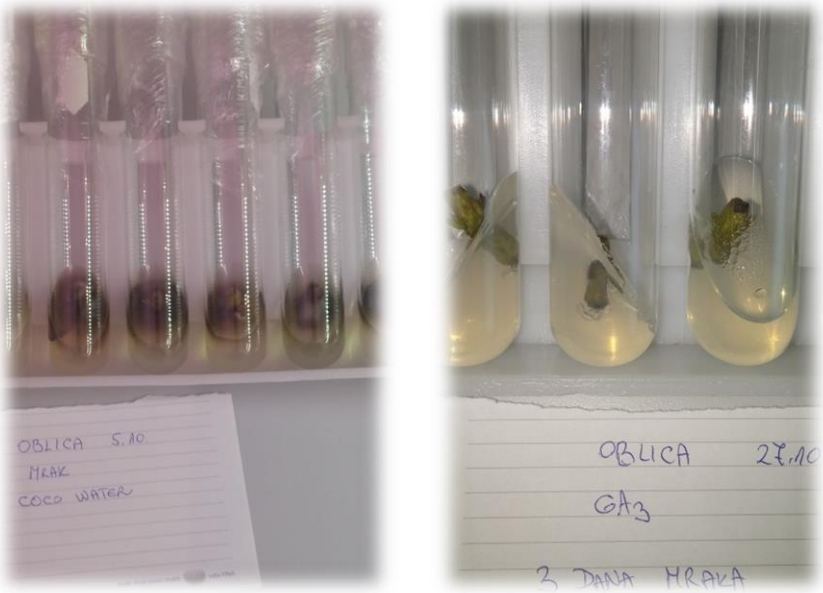
5.2.3. Oblica

Kultivar Oblica na tretmanu T2-COCOmrak (3.00^{A}) rezultirao je značajno većom kontaminacijom u odnosu na tretmane T1-COCO (0.33^{B}) i T3-GA3 (1.00^{B}) (slika 29a). Nije zabilježena značajna razlika između tretmana u posmeđenju eksplantata (slika 29b). Najveći mortalitet zabilježen je pri tretmanu T1-COCO (10.00^{A}) kod kojeg je došlo do odumiranja svih eksplantata u pokusu. Najmanji mortalitet zabilježen je pri tretmanima T2-COCOmrak (5.00^{C}) i T4-GA3mrak (4.00^{C}) koji je bio značajno manji u odnosu na ostale tretmane.

Tablica 9. *Statističke razlike između primijenjenjih tretmana na kultivaru Oblica u kontaminaciji, posmeđenju i mortalitetu eksplantata*

Oblica	Kontaminirani	Posmeđenje	Neživi
T1-COCO	0.33^{B}	1.00	10.00^{A}
T2-COCOmrak	3.00^{A}	1.00	5.00^{C}
T3-GA3	1.00^{B}	1.00	7.00^{B}
T4-GA3mrak	2.00^{AB}	0.33	4.00^{C}
F-test	*4.90*	*0.40*	*28.00*
p	*0.0321*	*0.7569*	*0.0001*

Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.5$



a) Kontaminacija b) Posmeđenje

Slika 29. Kontaminacija i posmeđenje Oblice (Foto: Frančišković, 2018.)

5.3. Razlike između tretmana po kultivaru u fenolnom posmeđenju eksplantata

Kao što je vidljivo iz tablice 10. tretmani koji su uključivali držanje eksplantata 3 dana u mraku (T2 i T4), odnosno kako navodi *Cassels i Minas (1983)* stavljanjem kulture u tamu s ciljem supresiji i izbjegavanju nakupljanja štetnih toksičnih tvari u mediju, jedino je tretman T4-GA3mrak (2.00^{B}) kod kultivara Drobnice rezultirao značajno manjim posmeđenjem u odnosu na klasični način bez stavljanja u mrak. Na ostalim kultivarima nije zabilježena značajna razliku između mračne i standardne faze u pojavi fenolnog posmeđenja medija.

Tablica 10. *Statističke razlike između primijenjenih tretmanima po sortama u fenolnom posmeđenju eksplantata*

	POSMEĐENJE		
	Drobnica	**Rosulja**	**Oblica**
T1-COCO	2.00^{B}	0.33^{B}	1.00
T2-COCOmrak	3.00^{B}	0.33^{B}	1.00
T3-GA3	5.00^{A}	2.00^{A}	1.00
T4-GA3mrak	2.00^{B}	2.00^{A}	0.33
F-test	*6.00*	*4.17*	*0.40*
p	*0.0191*	*0.0473*	*0.7569*

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

6. ZAKLJUČAK

Maslina pripada kulturi koja ima vrlo veliki gospodarsko - ekonomski značaj unutar mediteranske regije RH pa i šire u cijelome svijetu. Stoga je permanentno istraživanje u cilju standardizacije, razvoja ili poboljšanja već postojećih protokola vrlo važno i značajno za buduću rasadničarsku proizvodnju. Uspostavljanje aseptične kulture i spriječavanje oksidacije fenolnih komponenti predstavljaju vrlo bitne faze u samom procesu uvođenja kulture u *in vitro*. Također i genotip, izvor eksplanata te stručnost osobe koja provodi mikropropagaciju ključni su faktori uspješnog procesa.

Kultivar Oblica rezultirao je vrlo visokom stopom mortaliteta od 68%, kultivar Drobnica 53% i Rosulja 30%. Proliferacija je bila uspješna na samo 3 od ukupno 120 eksplantata (uspješnost proliferacije 2.5%) i to kod kultivara Rosulja (1 eksplantat) i Drobnica (2 eksplantata). Pretpostavljamo da je uspješnost razmnožavnja masline putem *in vitro* tehnike pod vrlo snažnim utjecajem samog genotipa (velike razlike između kultivara). Eksplantati kultivara Drobnice koji su inducirali proliferaciju bili su pod djelovanjem citokininskog tretmana koji je sadržavao kokosovu vodu i koji su proveli 3 prva dana u mraku. Također kod kultivara Rosulja eksplantat koji je inicirao proliferaciju bio je 3 dana u mraku ali pod utjecajem drugog korištenog citokinina GA_3. Uspješnost proliferacije pridodajemo upravo stavljanju eksplantata u mrak s ciljem smanjenja otpuštanja štetnih fenolnih spojeva iz eksplantata u medij. Kokosova voda u kombinaciji s BAP-om (50ml/l + 0.5ml/l) rezultirala je učinkovito u proliferaciji i daljnjem rastu eksplantata masline. Također i klasični citokinin GA_3 potvrdio je svoju učinkovitost u proliferaciji ali u manjem obimu u odnosu na kokosovu vodu.

Potapanje eksplantata u otopinu antioksidanata uz daljnju upotrebu adsorbanta polivinilpirolidona (PVP) u mediju, te izbor medija s odgovarajućim regulatorom rasta u našem slučaju kokosova voda, uz stavljanje kulture u tamu, pokazali su uspješnu kombinaciju u proliferaciji. Citokininski tretman kokosovom vodom + BAP, odnosno niska cijena kokosove vode nameće se kao učinkovita alternativa i supstitucija za skupi i najčešće korišteni citokinin zeatin u mikropropagaciji masline. Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti na preciznije određivanje i različite kombinacije koncentracija hormona na bazi kokosove vode, odnosno adsorbanata i metoda u supresiji nakupljanja toksično štetnih fenolnih tvari koje dovode do smrti eksplantata ne samo masline nego i

drugih strateški važnih voćnih vrsta u *in vitro* modelu proizvodnje. Pored fenolnih spojeva, eksplantat također otpušta i druge toksične tvari.

Fenolne komponente nisu jedina spojevi koji se oslobađaju iz mjesta reza na eksplantatu. Otpuštanje fenola u polukruti medij (agar) sporije je nego u tekućem mediju, odnosno sve se otpuštene tvari akumuliraju oko eksplantata. Fenoli se vrlo lako mogu detektirati u mediju zbog njihove oksidacije (posmeđenje, žućenje), dok neke druge tvari nisu vidljive golim okom. Također, potrebno je poboljšati i doraditi sterilizaciju (ozon – O_3, druge koncentracije korištenih sterilizanata) eksplantata prije uvođenja na medij zbog vrlo visoke stope kontaminacije koja je zabilježena u ovom istraživanju.

7. POPIS LITERATURE

Abousalim A., Brhadda N. and Loudiyi D., 2004. Essais de prolifération et d'enracinement de matériel issu de rajeunissement par bouturage d'oliviers adultes (Olea europaea L.) et de germination in vitro : effets de cytokinine et d'auxines. Biotechnology. Agronomical Society, 2004 (9), pp. 237-240.

Avidan, B.m Lavee, S. (1978): „ Physiological aspects of rooting ability of olive cultivars", Acta Horticulturae, 79, pp. 93-100

Azzi, G. (1952): „ Agroekologija", Nakladni zavod, Zagreb

Barranco D., Fernández D. and Rallo L., 1992. La Culture de l'olivier. Editions Mundi Prensa, coédité par le ministère de l'Agriculture et de la Pêche. European Journal of Agronomy : volume 21, issue 2, 1996, pp. 209-222

Bottari, V.,e Spina, P. (1952): „ le varieta di olive coltivate in Sicilia, Roma"

Broome C, Zimmerman HortScience 13: 151—153 RH (1978)

Brousse G. and Loussert R., 1999. L'olivier, éditions Maisonneuve (Paris, 1978, réédité en 1999. pp. 135-167.

Cassels AC, Minas G (1983) Scientia Horticulturae 21: 53—65

Cevie asbl, 1997. Les Multiples Applications de la Culture in vitro des Végétaux Supérieurs, 8ème édition, 154 pp.

Chaari-Rkhis A., Trigui A. and Drira N., 2006. Micropropagation of Tunisian cultivars olive trees: preliminary results. III International Symposium on Olive Growing. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant Volume 43, Number 5 / October, 2007, pp. 473-478.

CIDES, 1999. Micropropagation en entreprise – Cahier de références techniques Édition 1999. Centre d'information et de développement expérimental en serriculture.

Denninger C., Garnaud V. and Laverne J.P., 1993. Savoir tout faire au jardin. Ed. Readers Digest, 658pp.

Diamantoglou S. and Mitrakos K., 1981. Leaf longevity in Mediterranean evergreen sclerophylls. In Components of productivity in Mediterranean climate regions basic and applied aspects, Margaris N.S. and H. Mooney (Eds.), Dr. W. Junk Publishers, pp. 21-27.

DRŽAVNI ZAVOD ZA STATISTIKU RH 2007. Statistički ljetopis Republike Hrvatske 2006.

Fahn A., 1986. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. Ann. Bot, pp. 631-638.

Fontanazza G., Preciozi, O. (1989): „ Le olivo e le basce temperature“, Oservazioni 37 cultivar di olio e 20 cultivar da tavola, Le Italia agricola, 106, pp. 7-8

Giono P., Sorrentino G. and d' Andria R., 1999. Stomatal behaviour, leaf water status and photosynthetic response in field-grown olive trees under water deficit. Environm. Exper. Bot, 42:pp. 95-104.

Gucci R., Lombardini L. and Tattini M., 1997. Analysis of leaf water relations in leaves of two olives (olea europaea) cultivars differing in tolerance to salinity. Tree Physiology, 17, pp. 13-21.

Gupta PK, Nadgir AL, Mascarenhas AF, Jagannathan V (1980) Plant Science Lett. 17: 259—268.

Hartmann, H., T., Kester, D. (1968): „ Plant propagacion“, Prentice Hall, pp. 222-230

Hildebrandt V, Harney PM (1988) J. Hort. Sci. 63: 651—657

Hu CY, Wang PJ (1983) In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds)Handbook of plant cell culture, vol 1, Macmillan, New York, pp 177—217

Institut de Recherche Agricol (INRA, 2001). Biofutur. Dossier plantes transgéniques. Février, 48pp.

Ishii M, Uemoto S, Fugieda K (1979) J. Japanese Soc. Hort. Sci. 48: 199—204

Jančić, R. (2005.): Moja maslina, Službeni list, Beograd

Kovačević, I., Perica, S. 1994. Suvremeno maslinarstvo. Avium, Split

Lavee, S. (1992): „ Evolution of cultivacion technque in olivvei growing!, Olive oil quality, pp. 37-44, Firence

Lavee, S. (1996): „Biologia e fisiologia delle olivo“, Enciclopedia Mondiale delle olivo, Consiglio Oleicolo Internazinale, Madrid

Lloyd G, McCo~n B (lq80) Comb. Proc. I n t l . Plant Prop. Soc. 30: 421—427

Loomis WD, Battaile J (1966)Phytochemistry 5: 423—438

Martin G.C., 1996. Olea europaea L.

Mayer AM, Harel E (1979)Phytochemistry 18: 193—215

Mencuccini M., Micheli M. and Standardi A., 1995. Micropropagazione dell olivo : effetto di citochinine sulla proliferazione. Italis Hortus, 4, pp. 33-37.

Miljković, I. 1991. Suvremeno voćarstvo. Nakladni zavod Znanje, Zagreb

Miranovič Ksenija (2006)- Maslina (Olea europaea L.), Podgorica

Moreno F., Fernandez J.E., Clothier B.E. and Green S.R., 1996. Transpiration and root water uptake by olive trees. Plant and Soil, 184, pp. 85-96.

Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture: Physiology Plant 15, pp. 473-497.

Pagnol, I. (1975): „ Le olivier“, Aubanel, Avignon

Peixe, A., Raposo A., Lourenço R., Cardoso H. and Macedo E., 2007. Coconut water and BAP successfully replaced Zeatin in olive (Olea europaea L.) micropropagation, pp. 1-7.

Robison T (1983) The organic constituents of higher plants, Fifth ed. Cordus Press, North Amherst, Mass.

Rokba Z.A., Loxou V.K. and Lionakis S.M., 2000. Regeneration of olive (Olea europaea L.,) in vitro. Cost.843, WG1: Development biology or regeneration.1st meeting, 12-15 Oct, Geisenheim: pp. 25-26.

Rugini E., 1984. In vitro propagation of some olive (Olea europaea L.) cultivars with differentb rootability and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. Scientia Horticulturae 24, pp. 123-134.

Sakunasingh P., Thepsithar C. and Thongpukdee A., 2004. In vitro shoot culture of olive (Olea europaea L.) cv. Arbequina. Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand.

Technivit@wanadoo.fr, 2007. Les cultures in vitro et les techniques appliquées

Terral J.F., 1997. La domestication de l'Olivier en Méditerranée nord -occidentale : approche morphométrique et implications paléoclimatiques. Thèse, Université de Montpellier II, France, 136

Tombesi, A., Cartechini, A. (1986):“ +Leeffetto delleombreggiamento della chioma sulla differenziazione delle gemme a fiora dell olivo“, R. Orto floro frutti It; 70, pp. 277-285

Van der Vossen H.A., Mkamilo G.S., Corbière H., 2007. Oléagineux, Pub. Prota, 236 pp

Vaughn KC, Duke SO (1984) Physiol.Plant. &O: 106—112

Vieitez AM, Vieitez E (1980) Physiol. Plant. 50: 127-130

Weatherhead MA, Burdon $, Henshaw GG (1978) Z. Pflanzenphysiol. 89: 141—147

Zavod za sjemenarstvo i rasadničarstvo 2007. Izvješće o proizvodnji voćnih sadnica i loznih cijepova u 2006. godini, http://www.zsr.hr/ Izvjesca/Izvjesce_sad_06.pdf (20. lipnja 2007.).

Ziv M, Halevy AH (1983) HortScience 18: 434—436

Zohary, D., Spigel-Roy P. (1975): „ Beginning of fruit growing in the old borld“, Science, 187, pp. 319-327

Zryd JP., 1988. Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Lausanne, Suisse : Presses Polytechnique Romandes, 305 pp.

Zuccherelli G. and Zuccherelli S., 2003. In vitro propagation of fifty olive cultivars. ISHS Acta Horticulturae 586: IV International Symposium on Olive Growing.

Internetski izvori:

http://www.cro-eu.com/forum/index.php?topic=3091.0;wap2

http://www.oleacult.com/hr/o_nama_detalji/hrvatske-maslinarske-regije-4

https://www.agroklub.com/vocarstvo/strojevi-i-oprema-u-maslinarstvu/8968/

https://www.agroklub.com/vinogradarstvo/sortiment-najprofitabilnijih-maslina-u-hrvatskoj/10898/

https://agrobloghortikultura.wordpress.com/2016/04/01/oblica/

http://www.istria-gourmet.com/hr/gurmanski-dozivljaji/istarska-maslinova-ulja/glavne-sorte-maslina/autohtone/24-ch-0

http://www.velaluka.info/udruga-maslinara/sorte_maslina/drobnica.htm

http://www.maslinar.eu/hr/savjeti/Sorte-maslina/7/343/Item.aspx

https://agrobloghortikultura.wordpress.com/2016/04/01/oblica/

https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/ljetopis/2016/sljh2016.pdf

http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC

http://www.haifa-group.com/knowledge_center/crop_guides/olive_tree/growing_olives/

http://www.savjetodavna.hr/savjeti/23/621/cijepljenje-ili-navrtanje-maslina/

http://maslina.slobodnadalmacija.hr/maslinarsvo/clanak/id/477061/naucite-sto-su-ozegline-i-kako-ih-prepoznati

https://www.google.hr/search?hl=hr&biw=1517&bih=750&tbm=isch&sa=1&ei=n-LDWqzUJc2dkwX30pWYBA&q=guke+maslina&oq=guke+maslina&gs_l=psy-ab.3...30212.32492.0.33045.12.8.0.4.4.0.166.724.1j5.6.0....0...1c.1.64.psy-ab..2.9.652...0j0i30k1j0i10i30k1j0i19k1j0i30i19k1j0i24k1j0i13k1j0i13i30k1j0i13i5i30k1j0i8i13i30k1.0.4TYhdfBytOI#imgrc=sqwjmmyn4TMdoM:

https://www.slobodnadalmacija.hr/scena/mozaik/clanak/id/281958/kako-su-hrvati-pavle-antun-i-jakov-otkupili-getsemanski-vrt-u-jeruzalemu

http://www.gnojidba.info/gnojidba-masline/preporuka-gnojdbe-maslina-integrirana-proizvodnja-22016/

8. SAŽETAK

Mikropropagacija predstavlja vrlo efikasan alat za masovno širenje gospodarsko važnih vrsta voćaka u koje se ubraja i maslina. Ovo istraživanje provedeno je s ciljem ispitivanja mogućnosti mikropropagacije (sterilizacije, sprječavanja fenolnog posmeđenja i proliferacije) eksplantata masline (*Olea europaea L.*) u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva (labaratorij za voćarstvo) na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Nodijalni eksplantati inicirani su na WPM hranjivu podlogu koja je uključivala tretmane s dva različita citokininska hormona (COCO = kokosova voda + BAP 6-Benzylaminopurin; i GA3 = giberelinska kiselina + BAP 6-Benzylaminopurin) u indukciji proliferacije eksplantata masline s kombinacijom stavljanja eksplantata u mrak i bez mraka kao jedna od metoda u sprječavanju oksidacije fenola. Ostali predtretmani korišteni u cilju smanjenja fenolne oksidacije uključivali su aplikaciju PVP i antioksidativnog miksa. Kultivar Oblica rezultirao je vrlo visokom stopom mortaliteta nakon 30 dana od 68%, kultivar Drobnica 53% i Rosulja 30%. Proliferacija je bila uspješna na samo 3 od ukupno 120 eksplantata (uspješnost proliferacije 2.5%) i to kod kultivara Rosulja (1 eksplantat) i Drobnica (2 eksplantata). Eksplantati kultivara Drobnice koji su inducirali proliferaciju bili su pod djelovanjem citokininskog tretmana koji je sadržavao kokosovu vodu te su eksplantati proveli prva 3 dana u mraku. Također kod kultivara Rosulja eksplantat koji je inicirao proliferaciju bio je 3 dana u mraku. Kokosova voda u kombinaciji s BAP-om (50ml/l + 0.5ml/l) rezultirala je učinkovito u proliferaciji i daljnjem rastu eksplantata masline. Otpuštanje fenolnih komponenti koje su vidljive u mediju, ali i nekih drugih štetnih tvari koje nisu vidljive golim okom dovode do smrti eksplantata ne samo masline nego i drugih strateški važnih voćnih vrsta u *in vitro* modelu proizvodnje. Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti na preciznije određivanje različitih kombinacija koncentracija hormona na bazi kokosove vode, odnosno adsorbanata i metoda u supresiji nakupljanja toksično štetnih fenolnih tvari.

9. SUMMARY

Micropropagation is a very effective tool for the mass propagtion of economically important types of fruit seedling, including olives. This study was conducted to investigate the possibility of micropropagation (sterilization, prevention of phenol degradation and proliferation) olive (*Olea europaea L.*) by nodal explants. The research was set up in the laboratory for *in vitro* production at Faculty of Agriculture in Osijek (Chair of Horticulture – Fruit growing). Nodal explants were initiated on a WPM nutrient medium that included treatments of two different cytokine hormones (COCO = Coconut Water + BAP 6-Benzylaminopurine; and GA3 = Giberelic Acid + BAP 6-Benzylaminopurine) with placing the explants into the dark and without darkness as one of the methods to prevent phenol oxidation. Other pre-treatments used to reduce phenolic oxidation include PVP and antioxidant mix applications. Cultivar Oblica resulted with a high mortality rate after 30 days with 68%, cultivar Drobnica 53% and Rosulja 30%. Proliferation was successful at only 3 of total 120 explants (proliferation efficiency 2.5% = Rosulja cultivars 1 explants and Drobnica 2 explants). Explants of Drobnica cultivars, which induced proliferation, were under the influence of cytokine treatment containing coconut water and first 3 days in the dark. Also on Rosulja cultivar, the proliferation-induced explants was spent 3 days in the dark. Coconut water in combination with BAP (50 ml/l + 0.5 ml/ l) has resulted in effective proliferation and further growth of explants. The release of phenolic components that are visible in the media, as well as some other harmful substances that are not visible to eye, lead to the death not only olive explants but also other strategically important fruit species on *in vitro* production. Further research needs to be focused to more precisely determine the various combinations of coconut water-based hormone concentrations, or adsorbents and methods in suppressing the accumulation of toxic harmful phenol substances.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Intenzivna proizvodnja i maslina (za tržište) 19
Tablica 2. Proizvodnja maslinova ulja 19
Tablica 3. Sastav hranjive podloge WPM korištene u istraživanju 34
Tablica 4. Korištene kombinacije fungicida i antibiotika u sterilizaciji eksplantata 36
Tablica 5. Tretmani u pokusu 37
Tablica 6. Statističke razlike na razini cijelog pokusa između kultivara, tretmana i interakcija kultivar x tretman za promatrane parametre kontaminacija, posmeđenje i mortalitet eksplantata. 45
Tablica 7. Statističke razlike između primijenjenjih tretmana na kultivaru Drobnica u kontaminaciji, posmeđenju i mortalitetu eksplantata 46
Tablica 8. Statističke razlike između primijenjenjih tretmana na kultivaru Rosulja u kontaminaciji, posmeđenju i mortalitetu eksplantata 48
Tablica 9. Statističke razlike između primijenjenjih tretmana na kultivaru Oblica u kontaminaciji, posmeđenju i mortalitetu eksplantata 49
Tablica 10. Statističke razlike između primijenjenih tretmanima po sortama u fenolnom posmeđenju eksplantata 50

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Getsemanski vrt 3
Slika 2. Divlja maslina……...6
Slika 3. Korijen masline 7
Slika 4. Deblo masline 8
Slika 5. Grančice masline 8
Slika 6. List 9
Slika 7. Početak razvoja cvijeta 11
Slika 8. Plodovi masline na početku prerade 12
Slika 9. Ožegotine na deblu masline 15
Slika 10. Razvojne regije masline 19
Slika 11. Guke masline 24
Slika 12. Spajanje plemke i podloge 25
Slika 13. Eksplatanti na hranjivoj podlozi 26
Slika 14. Eksplantant masline 27
Slika 15. Laboratorij na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku 30
Slika 16. Matičnjak 31
Slika 17. Klima komora 31
Slika 18. Oblica 32
Slika 19. Drobnica 33
Slika 20. Rosinjola 33
Slika 21. Vodoopija 35
Slika 22. Eksplantant 35
Slika 23. Incijacija u epruvetama 36
Slika 24. Eksplantanti na magnetnoj mješalici 36
Slika 25. Tretman 1 (BAP+ COCO) 38
Slika 26. Dodavanje giberelinske kiseline nakon autoklaviranja 38
Slika 27. Kontaminacija, fenolno posmeđenje i proliferacija Drobnice 47
Slika 28. Kontaminacija, posmeđenje i proliferacija Rosulje 48
Slika 29. Kontaminacija i posmeđenje Oblice 49

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Proizvodnja i prinos maslina u Europi 21
Grafikon 2. Proizvodnja i prinos maslina u svijetu 21
Grafikon 3. Prvih 10 proizvođača maslina 22
Grafikon 4. Kontaminacija nakon 15 dana 39
Grafikon 5. Posmeđenje nakon 15 dana 40
Grafikon 6. Proliferacija nakon 30 dana 42
Grafikon 7. Mortalitet ekspantata nakon 30 dana 43

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Sveučilišni diplomski studij, smjer: Voćarstvo

POSMEĐENJE EKSPLANTATA MASLINE (*OLEA EUROPAEA L.*)

U KULTURI IN VITRO

Lina Frančišković

Sažetak: Mikropropagacija predstavlja vrlo efikasan alat za masnovno širenju gospodarsko važnih vrsta voćaka u koje se ubraja i maslina. Ovo istraživanje provedeno je s ciljem ispitivanja mogućnosti mikropropagacije (sterilizacije, sprječavanja fenolnog posmeđenja i proliferacije) eksplantata masline (*Olea europaea L.*) u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva (labaratorij za voćarstvo) na Poljoprivredniom fakultetu u Osijeku. Nodijalni eksplantati inicirani su na WPM hranjivu podlogu koja je uključivala tretmane s dva različita citokininska hormona (COCO = kokosova voda + BAP 6-Benzylaminopurin; i GA3 = giberelinska kiselina + BAP 6-Benzylaminopurin) u indukciji proliferacije eksplantata masline s kombinacijom stavljanja eksplantata u mrak i bez mraka kao jedna od metoda u sprječavanju oksidacije fenola. Ostali predtretmani korišteni u cilju smanjenja fenolne oksidacije uključivali su aplikaciju PVP i antioksidativnog miksa. Kultivar Oblica rezultirao je vrlo visokom stopom mortaliteta nakon 30 dana od 68%, kultivar Drobnica 53% i Rosulja 30%. Proliferacija je bila uspješna na samo 3 od ukupno 120 eksplantata (uspješnost proliferacije 2.5%) i to kod kultivara Rosulja (1 eksplantat) i Drobnica (2 eksplantata). Eksplantati kultivara Drobnice koji su inducirali proliferaciju bili su pod djelovanjem citokininskog tretmana koji je sadržavao kokosovu vodu te su eksplantati proveli prva 3 dana u mraku. Također kod kultivara Rosulja eksplantat koji je inicirao proliferaciju bio je 3 dana u mraku. Kokosova voda u kombinaciji s BAP-om (50ml/l + 0.5ml/l) rezultirala je učinkovito u proliferaciji i daljnjem rastu eksplantata masline. Otpuštanje fenolnih komponenti koje su vidljive u mediju, ali i nekih drugih štetnih tvari koje nisu vidljive golim okom dovode do smrti eksplantata ne samo masline nego i drugih strateški važnih voćnih vrsta u in vitro modelu proizvodnje. Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti na preciznije određivanje različitih kombinacija koncentracija hormona na bazi kokosove vode, odnosno adsorbanata i metoda u supresiji nakupljanja toksično štetnih fenolnih tvari.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Aleksandar Stanisavljević

Broj stranica: 62
Broj grafikona i slika: 35
Broj tablica: 10
Broj literaturnih navoda: 72
Broj priloga: 0
Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: maslina, mikropropagacija, fenolno posmeđenje, eksplantat

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Brigita Popović, predsjednik

2. Izv. prof. dr. sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor

3. Doc.dr.sc. Mato Drenjančević, član

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate work**
Faculty of Agriculture in Osijek
University graduate study, course: Pomiculture

EXPLANT BROWNING OF *IN VITRO* CULTURED OLIVES (*Olea europaea L.*)

Lina Frančišković

Abstract: Micropropagation is a very effective tool for the mass propagtion of economically important types of fruit seedling, including olives. This study was conducted to investigate the possibility of micropropagation (sterilization, prevention of phenol degradation and proliferation) olive (*Olea europaea* L.) by nodal explants. The research was set up in the laboratory for in vitro production at Faculty of Agriculture in Osijek (Chair of Horticulture – Fruit growing). Nodal explants were initiated on a WPM nutrient medium that included treatments of two different cytokine hormones (COCO = Coconut Water + BAP 6-Benzylaminopurine; and GA3 = Giberelic Acid + BAP 6-Benzylaminopurine) with placing the explants into the dark and without darkness as one of the methods to prevent phenol oxidation. Other pre-treatments used to reduce phenolic oxidation include PVP and antioxidant mix applications. Cultivar Oblica resulted with a high mortality rate after 30 days with 68%, cultivar Drobnica 53% and Rosulja 30%. Proliferation was successful at only 3 of total 120 explants (proliferation efficiency 2.5% = Rosulja cultivars 1 explants and Drobnica 2 explants). Explants of Drobnica cultivars, which induced proliferation, were under the influence of cytokine treatment containing coconut water and first 3 days in the dark. Also on Rosulja cultivar, the proliferation-induced explants was spent 3 days in the dark. Coconut water in combination with BAP (50 ml/l + 0.5 ml/ l) has resulted in effective proliferation and further growth of explants. The release of phenolic components that are visible in the media, as well as some other harmful substances that are not visible to eye, lead to the death not only olive explants but also other strategically important fruit species on in vitro production. Further research needs to be focused to more precisely determine the various combinations of coconut water-based hormone concentrations, or adsorbents and methods in suppressing the accumulation of toxic harmful phenol substances.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Aleksandar Stanisavljević

Number of pages: 62
Number of figures and pictures: 35
Number of tables: 10
Number of references: 72
Number of appendices: 0
Original in: Croatian

Key words: olives, micropropagation, phenolic browning, explants

Reviewers:

1. Brigita Popović, Ph.D.,assoc.prof., president

2. Aleksandar Stanisavljević, Ph.D.assoc.prof., mentor

3. Mato Drenjančević, asst.prof., member

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