

# Mikropropagacija maline (*Rubus idaeus* L.) u tekućem imerznom sustavu

---

Jaređić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:379642>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-26**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical  
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of  
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK**

Ivana Jaredić, apsolvant

Diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**MIKROPROPAGACIJA MALINE (*Rubus idaeus L.*) U TEKUĆEM IMERZNOM  
SUSTAVU**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK**

Ivana Jaredić, apsolvent

Diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

**MIKROPROPAGACIJA MALINE (*Rubus idaeus L.*) U TEKUĆEM IMERZNOM  
SUSTAVU**

**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. Dejan Agić, član

**Osijek, 2018.**

## SADRŽAJ

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. UVOD</b>                                                                           | 1  |
| <b>2. PREGLED LITERATURE</b>                                                             | 2  |
| 2.1. <i>Rubus idaeus</i> L. – Porijeklo i rasprostranjenost                              | 2  |
| 2.2. Proizvodnja maline u svijetu i u Republici Hrvatskoj                                | 4  |
| 2.3. Morfologija maline                                                                  | 7  |
| 2.3.1. <i>Korijen</i>                                                                    | 7  |
| 2.3.2. <i>Stablo – izdanak</i>                                                           | 8  |
| 2.3.3. <i>List</i>                                                                       | 9  |
| 2.3.4. <i>Cvijet</i>                                                                     | 10 |
| 2.3.5. <i>Sjeme</i>                                                                      | 11 |
| 2.3.6. <i>Plod</i>                                                                       | 11 |
| 2.4. Razmnožavanje maline u kulturi tkiva <i>in vitro</i>                                | 12 |
| 2.4.1. <i>Uvođenje maline u in vitro uvjete</i>                                          | 13 |
| 2.4.2. <i>Umnožavanje ili multiplikacija maline in vitro</i>                             | 15 |
| 2.4.3. <i>Ukorjenjavanje maline u in vitro uvjetima</i>                                  | 16 |
| 2.4.4. <i>Aklimatizacija maline u uvjetima ex vitro</i>                                  | 18 |
| 2.4.5. <i>Princip propagacije maline uporabom suvremenih TIB/TIS sustava bioreaktora</i> | 20 |
| 2.5. Dosadašnja istraživanja na malini                                                   | 23 |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b>                                                            | 25 |
| 3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija za kulturu tkiva                              | 25 |
| 3.2. Biljni materijal                                                                    | 26 |
| 3.3. Tretmani u istraživanju                                                             | 27 |
| 3.3.1. <i>MS modificirani medij (MSm)</i>                                                | 29 |
| 3.3.2. <i>DKW medij</i>                                                                  | 29 |
| 3.3.3. <i>EDDHA</i>                                                                      | 30 |
| 3.3.4. <i>FeNaEDTA</i>                                                                   | 31 |
| 3.3.5. <i>Sustav i konzistencija medija</i>                                              | 31 |
| 3.5. Mjerenja u istraživanju                                                             | 32 |
| 3.6. Obrada podataka                                                                     | 33 |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>4. REZULTATI</b>                                                                                                  | 34 |
| 4.1. Vizualna opažanja tijekom razvoja                                                                               | 34 |
| 4.2. pH vrijednost medija u tekućem sustavu                                                                          | 35 |
| 4.3. Multiplikacija biljaka                                                                                          | 36 |
| 4.3.1. Multiplikacija na polučvrstom mediju ( <i>konvencionalni in vitro model</i> )                                 | 36 |
| 4.3.2. Multiplikacija na tekućem mediju ( <i>TIB sustav</i> )                                                        | 38 |
| 4.4. Morfološki parametri na polučvrstom mediju                                                                      | 39 |
| 4.5. Morfološki parametri na tekućem mediju                                                                          | 41 |
| <b>5. RASPRAVA</b>                                                                                                   | 43 |
| 5.1. Razlike između tretmana na polučvrstom mediju ( <i>konvencionalni in vitro model</i> )                          | 44 |
| 5.2. Razlike između tretmana na tekućem mediju ( <i>Imerzni TIB sustav</i> )                                         | 45 |
| 5.3. Razlike između sustava (polučvrsti i tekući medij) unutar tretmana DKW FeEDDHA,<br>DKW FeNaEDTA i MS(m) FeEDDHA | 45 |
| <b>6. ZAKLJUČAK</b>                                                                                                  | 47 |
| <b>7. POPIS LITERATURE</b>                                                                                           | 49 |
| <b>8. SAŽETAK</b>                                                                                                    | 57 |
| <b>9. SUMMARY</b>                                                                                                    | 58 |
| <b>10. POPIS TABLICA</b>                                                                                             | 59 |
| <b>11. POPIS SLIKA</b>                                                                                               | 60 |
| <b>12. POPIS GRAFIKONA</b>                                                                                           | 62 |

## 1. UVOD

Malina (*Rubus idaeus L.*) predstavlja voćnu vrstu koja ima izraženu nutri-farmaceutsku vrijednost na globalnom tržištu svježe hrane, te u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Posljednjih godina sve je veći trend podizanja novih i rekonstrukcije postojećih trajnih nasada kao posljedica politike mjera ruralnog razvoja, odnosno zajedničkih potpora RH i EU. Uslijed toga pojavila se i povećana potreba za sadnim materijalom svih voćnih vrsta, a među njima i maline (*Rubus idaeus L.*). Osjetljivost na virusna oboljenja čini ju neophodnom za proizvodnju u kulturu tkiva – bezvirusni sadni materijal.

Upravo ove situacije predstavljaju razlog velikog interesa istraživača i rasadničara u standardizaciji, poboljšanju ili razvoju novih tehnika i modela razmnožavanja. Propagacija putem *in vitro* modela (kultura tkiva) predstavlja suvremenu biotehnološku metodu masovne proizvodnje genetski identičnih, fiziološki uniformnih i zdravih biljaka. Prednosti su višestruke, manje potrebe za proizvodnom površinom, kratak vremenski interval proizvodnje, manja količina početnog inicijalnog baznog materijala, dugo čuvanje klonskog materijala, prenošenje, itd.

Konvencionalni *in vitro* model mikropropagacije limitiran je uporabom čvrstih ili polučvrstih medija, odnosno agara koji poskupljuje proizvodnju u odnosu na suvremeni imerzni sustav. Imerzni sustav koristi tekući hranjivi medij kojeg je moguće mijenjati u svakom trenutku. Sustav ima širok raspon proizvodnje različitog biljnog materijala, biomase, primarnih i sekundarnih metabolita, potpuno je automatiziran te vrlo brz i efikasan. Učinkovitost mikropropagacije maline na tekućem i polutekućem mediju uvelike ovisi i o genotipu, različitim koncentracijama regulatora rasta i hraniva, staničnoj osjetljivosti i afinitetu biljnih receptora na regulatore rasta. Izbor pravilnog i/ili modifikacija postojećeg medija predmet je mnogih istraživanja u standardizaciji propagacije maline modelom *in vitro*.

Optimizacijom medija za malinu osigurala bi se bolja komercijalna produkcija mnogih vrsta i kultivara iz roda *Rubus sp.*

Cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnost optimizacije i standardizacije protokola mikropropagacije maline uporabom imerznih bioreaktora (TIS/TIB) nove generacije koji koriste sustav povremene imerzije biljnog materijala uz modifikaciju mineralnih komponenti pojedinih medija.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. *Rubus idaeus* L. – Porijeklo i rasprostranjenost

Malina se spominje još u kameno i brončano doba. Pilinije je prvi naglasio (I. stoljeće) postojanje divlje maline na planinama Ida u Srednjoj Aziji, te otuda i potječe ime *Rubus idaeus*. Paladius je u IV. stoljeću malinu nazvao voćnom kulturom. Rimljani i Grci su malinu pretežiti upotrebljavali kao lijek. U XVI. stoljeću (1548.) javlja se u kulturi u zapadnoj Europi, krajem XVII. stoljeća u Americi, a početkom XIX. stoljeća u Rusiji.

Malina je jedna od svjetskih rasprostranjenih biljaka. Najveći broj vrsta maline potječe iz Azije, slijedi ju Sjeverna Amerika, dok znatno manje vrsta je zastupljeno u Europi, Južnoj Americi i ostalim dijelovima svijeta. Postoje tri vrste maline koje su sudjelovale u stvaranju plemenitih sorti maline, a to su:

- Crvena malina (*Rubus Idaeus* L.)
- Crna malina (*Rubus occidentalis* L.)
- Ljubičasta ili purpurna malina (*Rubus neglectus* Peck.)

Najvažnija vrsta maline je crvena malina (*Rubus idaeus* L.) (lika 1). Rasprostranjena je u Europi, Aziji i Sjevernoj Americi na sunčanim, sjenovitim, suhim i vlažnim mjestima, te je također rasprostranjena i po šumama kao samonikla biljka.

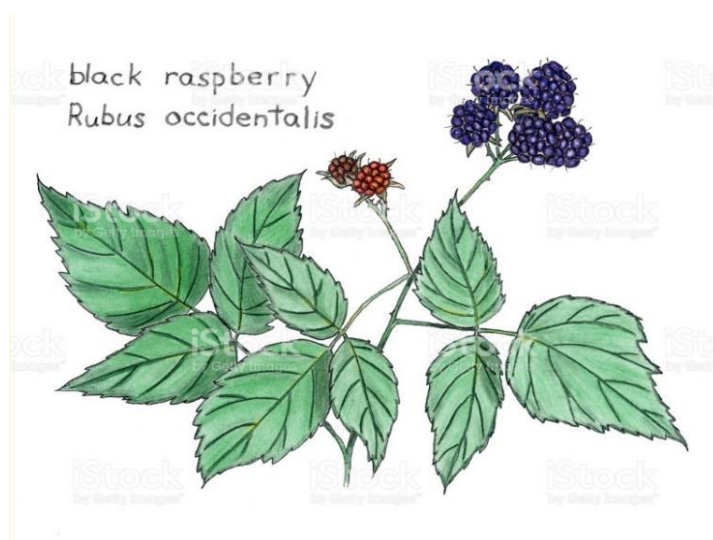
Najznačajnije podvrste crvene maline su:

- ❖ Europska crvena malina (*Rubus idaeus* subsp. *vulgatus* Arrh.)
- ❖ Američka crvena malina (*Rubus idaeus* subsp. *strigosus* Michx.)



**Slika 1.** Crvena malina - *Rubus idaeus* L. (Izvor: <http://www.i-flora.com> )

Crna malina (*Rubus occidentalis* L.) (Slika 2.) porijeklom je iz Sjeverne Amerike. Rasprostranjena je uglavnom u unutrašnjim dijelovima SAD-a. Mnoge sorte crne maline ne uzgajaju se u SAD-u. Crna malina koristila se za stvaranje mnogih sorti. Hibridizacijom crne i crvene maline nastala je ljubičasta ili purpurna malina.



**Slika 2.** Crna malina - *Rubus occidentalis* L. (Izvor: <https://www.gettyimages.com>)

Ljubičasta ili purpurna malina (*Rubus neglectus* Peck.) (Slika 3.) prirodni je hibrid *Rubus occidentalis* (majka) i *Rubus idaeus* subsp. *strigosus* (otac). Rasprostranjena je na području Sjeverne Amerike gdje se uzgaja od 1835. godine.



**Slika 3.** Ljubičasta ili purpurna malina - *Rubus neglectus* Peck.

(Izvor: <https://www.ebay.co.uk>)

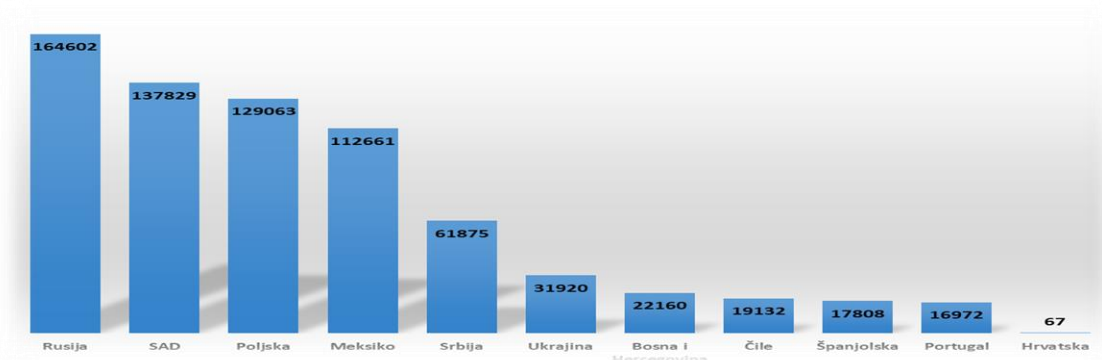


Krajem XVIII. stoljeća već je bilo opisano 16 sorata *R. vulgatus*, 10 sorata *R. strigosus*, 9 hibrida između *R. vulgatus* x *R. strigosus* i 7 hibrida dominantnih osobina *R. strigosus* i tragovima *R. occidentalis*. Maline su se počele masovno uzgajati u XIX. stoljeću, kada su se planskom selekcijom i hibridizacijom izdvojile i stvorile visokoproduktivne i visokokvalitetne sorte. U našoj zemlji divlje maline (*R. idaeobatus idaeus*) postoje otkad postoje i naše šume. Za kulturne sorte sigurno je da datiraju od prije nekoliko stoljeća, a njihov masovni uzgoj počinje tek početkom XX. stoljeća.

Kultiviranih sorti malina ima nekoliko stotina. Potječu uglavnom od europske crvene maline (*R. idaeus vulgatus* Arrh.), američke crvene maline (*R. idaeobatus strigosus* Michx.) i crne maline (*R. idaeobatus occidentalis* L.). Prirodni hibrid je ljubičasta malina (*R. idaeobatus neglactus* Peck.) dobivena od *R. idaeobatus strigosus* i *R. idaeobatus occidentalis*. Od tih vrsta maline postale su skoro sve današnje sorte s krupnim plodom, kao i mnoge druge sorte ili forme (*Loganberry* i dr.) u okviru podroda *Eubatus* (kupina).

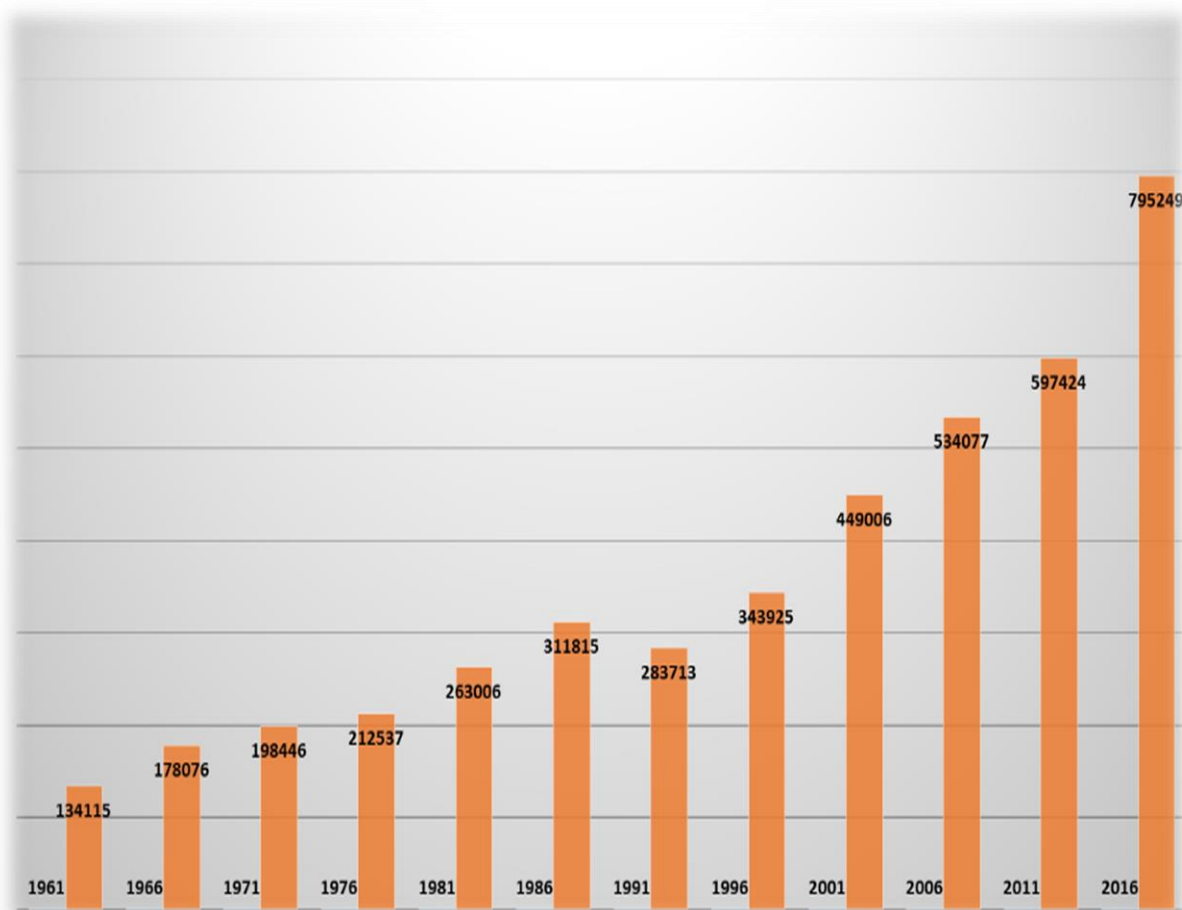
## 2.2. Proizvodnja maline u svijetu i u Republici Hrvatskoj

Prema podacima iz 2016. godine (FAOSTAT 2016.) u svijetu je sveukupno proizvedeno 795.249 tona malina. Postoje tri vodeća svjetska proizvođača malina (Grafikon 1.). Na prvom mjestu nalazi se Rusija sa 164.602 tona. Slijede ju SAD sa 137.829, te Poljska sa 129.063,00 tona. Zanimljivo je da Srbija zauzima peto mjesto na ljestvici najvećih svjetskih proizvođača maline sa prinosom od 61.875,00, dok susjedna Bosna i Hercegovina zauzima sedmo mjesto sa 22.160,00 tone proizvodnje maline. Usporedno s navedenim državama, Hrvatska se nalazi na dalekom četrdesetom mjestu proizvodnje maline sa svega 67,00 tona prinosa.



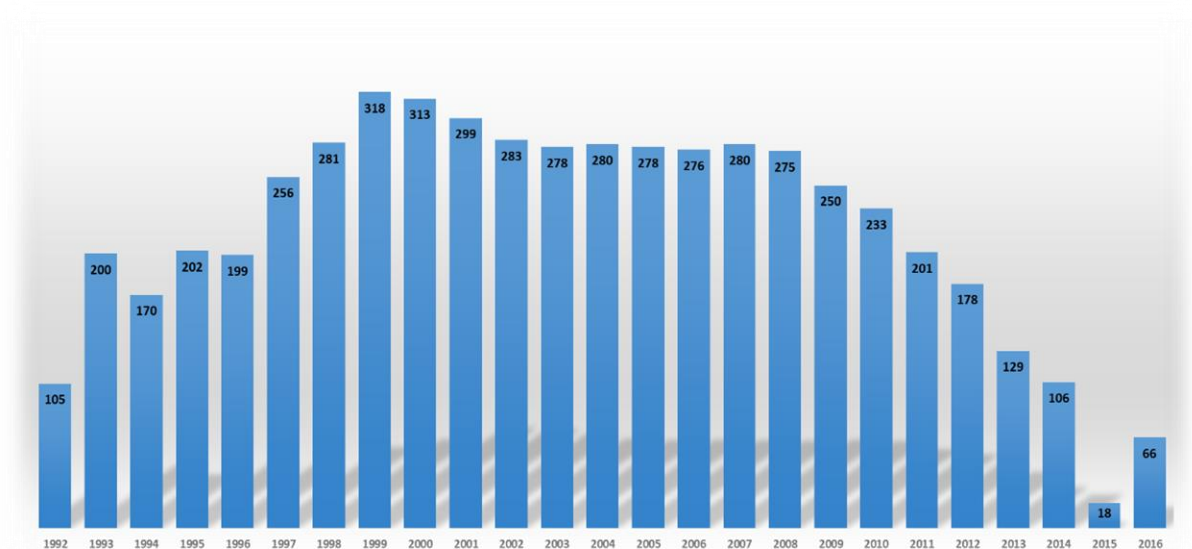
**Grafikon 1.** Svjetska proizvodnja maline za 2016. godinu u tonama  
(Izvor: FAOSTAT, 2016.)

Proizvodnja maline u svijetu u porastu je od zapisa podataka iz 1961. godine. U grafikonu 2. analizirano je svakih pet godina proizvodnje. Tako je svjetska proizvodnja maline 1961. godine iznosila 134.115,00 tona, dok je pet godina kasnije, točnije 1966. godine, iznosila 178.076,00 tona sveukupnog prinosa. Iz grafikona je vidljivo kako je godinama proizvodnja uglavnom u porastu, te je usporedno s 1961. godine sveukupni prinos maline u 2016. godini daleko veći, odnosno 795.249,00 tona.



**Grafikon 2.** Trend povećanja svjetske proizvodnje maline, 1961. do 2016. godina  
(Izvor: FAOSTAT)

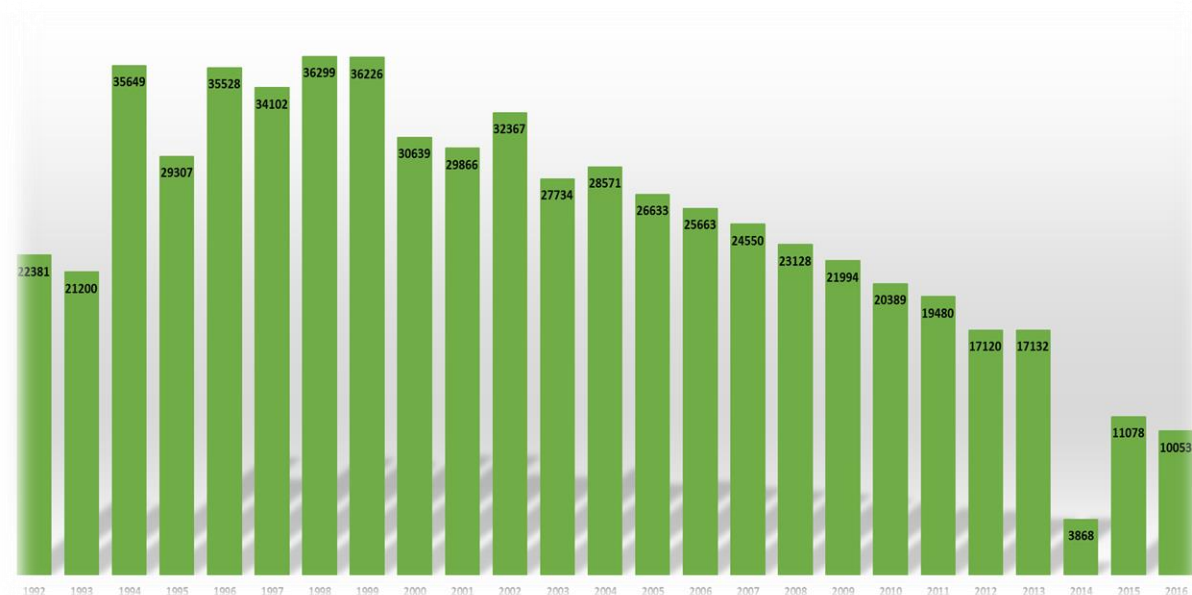
Proizvodnja maline u Republici Hrvatskoj mijenjala se tijekom godina (Grafikon 3.). Prema podacima (FAOSTAT, 2016.) iz 2016. godine sveukupna količina proizvodnje u tonama iznosila je 67 tona. Najveću proizvodnju maline Hrvatska je imala 1999. godine, 1.152,00 tone, dok je najmanji prinos zabilježen u 2015. godini te je iznosio svega 20,00 tona. Činjenica je da na popisu državnog zavoda za statistiku Republike Hrvatske maline, kao kulture nema na popisu. Razlog tome su zanemarive količine proizvodnje u odnosu na druge kulture u voćarstvu.



**Grafikon 3.** Trend proizvodnje maline u RH, 1999. do 2016. godine (*Izvor: FAOSTAT*)

U 2016. godini (*FAOSTAT, 2016.*) Republika Hrvatska nalazi se na 33. mjestu svjetske ljestvice po zasađenim hektarima maline, odnosno 66 hektara površine. Kada je riječ o količini prinosa proizvodnje po jedinici površine, u ovom slučaju hektaru, Hrvatska zauzima 39. mjesto u svijetu sa 1,053 tone po hektaru.

U grafikonu 4. korištena mjerna jedinica je hektogram po hektru, iz kojeg je vidljivo kako se prinosi proizvodnje po jedinici površine iz godine u godinu u Republici Hrvatskoj sve više smanjuju. S obzirom na podatke iz 1992. pa sve do 2016. godine, najveći prinos Hrvatska je imala 1998. godine u iznosu od približno 4 tone po hektru (3,63 t/ha).



**Grafikon 4.** Prinos maline po hektaru od 1992. do 2016. godine u RH (*Izvor: FAOSTAT*)

## 2.3. Morfologija maline

Malina (*Rubus idaeus* L.) pripada višegodišnjoj biljci carstva *Plantaea*, redu *Rosales*, porodici ruža (*Rosaceae*), potporodici *Rosoideae*, te rodu *Rubus*. Raste u obliku grma te je listopadna biljka. Organi maline dijele se na vegetativne i generativne. U vegetativne organe pripadaju korijen, stablo i list te služe u održavanju životnih funkcija biljke. Cvijet, plod i sjeme pripadaju generativnim organima maline i njihova je zadaća omogućiti održavanje i opstanak vrste. Korijen je podzemni, odnosno geofilni organ maline, dok list, cvijet, sjeme i plod pripadaju nadzemnom, drugim riječima aerofilnom organu biljke. Podzemno stablo crvene maline je višegodišnje, dok je nadzemno stablo dvogodišnje.

### 2.3.1. Korijen

Korijen maline (Slika 4.) raste neograničeno vrhom u zemlji te je višegodišnji organ biljke. Neke od bitnijih funkcija korijena su:

- učvršćivanje maline za tlo (zemljišna statika)
- usvajanje vode i u njoj rastvorene mineralne tvari koje provodi u izdanak
- stvaranje i skladištenje organskih tvari kao što su aminokiseline, bjelančevine i masti
- reguliranje oksidacijsko-redukcijskih procesa

U vlažnom tlu korijen maline živi u zajednici sa gljivama (mikoriza), gdje malina osigurava ugljikohidratnu, a gljive dušičnu ishranu.

Pravi ili glavni korijen maline razvija se iz korijena klice sjemena. On se grana i tvori bočno korijenje I, II i III reda. Glavni korijen ubrzo gubi na funkciji te njegovu ulogu preuzimaju adventivno korijenje koje se razvija iz podzemnog dijela stabla. Osnovna masa korijena crvene maline sastoji se od finih, vlaknastih, apsorpcijskih korijenja, koji se najčešće protežu do dubine 50 centimetara. Korijen crne maline je snažnije građe i prodire dublje nego korijen crvene maline. Korijenov sistem maline raste brže u periodima kad je porast izdanaka slabiji.



**Slika 4.** Korijen maline (Foto: Jaredić, 2018.)

### **2.3.2. Stablo - izdanak**

Stablo crvene, crne i ljubičaste ili purpurne maline ima oblik grma, cilindrično je i radijalne građe (Slika 5.). Stablo zajedno sa lišćem tvori izdanak maline (crvena, crna i purpurna) sa dvogodišnjim nadzemnim izdancima rastu vrhom isključivo tijekom prve vegetacije, a tijekom druge vegetacije na istim izdancima se formiraju rodne grančice. Podzemni dio izdanka maline je višegodišnji te je bogat rezervnim hranjivim tvarima.

U drugoj polovici vegetacijskog perioda na podzemnim izdancima i na mladim žilama crvene maline stvara se veći broj podzemnih pupoljaka, od kojih naredne godine nastaju novi i mladi izdanci. Na podzemnom dijelu izdanaka tijekom vegetacije razvija se adventivno korijenje.

Crvena malina razmnožava se izdancima, a crna malina oživljavanjem vrhova izdanaka. Ljubičasta ili purpurna malina razmnožava se izdancima i oživljavanjem vrhova izdanaka. Jednogodišnji izdanci maline dostižu različitu dužinu koja se kreće od nekoliko desetaka centimetara pa sve do preko četiri metra. Izdanci srednje dužine (1,5 do 2,5 metara) donose obično obilan urod u drugoj vegetacijskoj godini. Izdanci većine sorti crvene maline, kao što su Willamette, Meeker, Tulameen, Chilliwick, imaju trnje i dlačice. Postoje izdanci iz škotskih sorti iz tzv. „Glen serije“ koji nemaju trnje i dlačice, a to su primjerice Glen Ample, Glen Shee, Glen Lyon, Glen Doll i druge. Jednogodišnji izdanci maline sazrijevaju od osnove prema vrhu. S toga sorte koje su osjetljive na mraz prvo izmrzavaju na vrhovima izdanaka.

Na jednogodišnjim izdancima dvorodnih sorti maline, kao što su Heritage, Polana, Autumn Bliss te Polka, vršni pupoljci razvijaju se u rodne grančice i donose prve plodove u srpnju i kolovozu, te plodonose sve do kraja listopada, ovisno o sorti i o uvjetima okoline u kojoj se nalaze. Izdanci dvorodnih sorti u pravilu su kraći nego izdanci jednorodnih sorti, koji rode samo u lipnju i srpnju u drugoj godini vegetacije.

Tijekom druge vegetacije izdanci jednorodnih sorti maline ne rastu u dužinu, sekundarno se ne debljaju i ne stvaraju godove. U proljeće sljedeće godine oko 2/3 bočnih pupoljaka na izdancima razvijaju se u rodne grančice koji nose cvjetove i plodove. Najveći broj i najkvalitetniji plodovi maline formiraju se na rodnim grančicama na srednjoj trećini izdanka. Ubrzo poslije berbe dvogodišnji izdanci se osuše stoga ih treba ukloniti kako ne bi ometali rast i razvoj novih izdanaka maline.

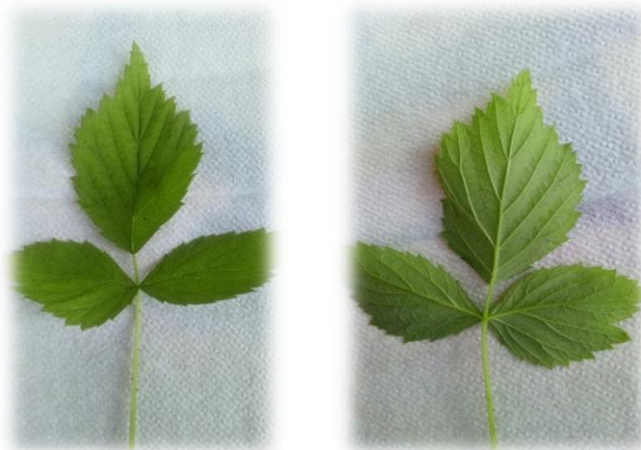


**Slika 5.** Stabljika/izdanci maline (Foto: Jaredić, 2018.)

### **2.3.3. List**

List je vrlo važan vegetativni organ maline. Može nastati od klice, tzv. kotiledoni, te od lisnih začetaka na vegetativnoj strani stabljike iz koje nastaju pravi listovi. Rast listova kod maline počinje u travnju, dok opadanje lišća počinje poslije jačih mrazeva, u listopadu i studenom. Građa lista maline sastoji se od lisne osnove, lisne peteljke te tri ili pet liski. Liskina nervatura je perastog oblika, dok je obod liske pilasto nazubljen (Slika 6.).

Fotosinteza, disanje te transpiracija su fiziološki procesi koji se odvijaju u listu. Najvažniji dio lista maline je liska. Lice liske nalazi se na gornjoj strani, glatko je i tamnozeleno boje. Naličje liske nalazi se na donjoj strani te je blijedozelene boje. Na naličju liske nalaze se puči ili tzv. stome kroz koje se odvija izmjena plinova. Listovi su na izdanku maline spiralno raspoređeni. Građa listova te njihov spiralan raspored omogućuju malini ravnomjerno iskorištavanje raspoložive količine svjetlosti u procesu fotosinteze. Što je veća površina dobro osunčanih i zdravih listova maline, veća je i količina stvaranja asimilacije u procesu fotosinteze. U takvim uvjetima intenzivnije se razvijaju cvjetni pupoljci, plodovi, povećava se rodnost te se poboljšava i sama kvaliteta plodova.



**Slika 6.** Lice (lijevo) i naličje lista (desno) maline (Foto: Jaredić, 2018.)

#### **2.3.4. Cvijet**

Vrijeme formiranja cvjetnih pupoljaka na izdancima crvene maline ovisi o vrsti sorte, odnosno radi li se o jednorodnim ili dvorodnim sortama. Kod jednorodnih sorti cvjetni pupoljci formiraju se na jednogodišnjim izdancima tijekom rujna i listopada u godini koja prethodi cvatnji. Na vrhovima izdanka dvorodnih sorti crvene maline formiraju se cvjetni pupoljci, cvjetovi i plodovi već tijekom prve godine (Slika 7.).

Cvijet privredno značajnih sorti crvene maline je hermafroditan (dvospolan). Sastoji se od pet listića čašice zelene boje, pet cvjetnih listića bijele ili blijedo ružičaste boje, 60 do 90 prašnika, te mnogo tučkova (karpela) 20 do 200. Svaka karpela gradi poseban ili apokarpan tučak. Tučci se nalaze na ispupčenoj, poluloptastoj cvjetnoj loži. Cvijet maline je mirisan te polusimetričnog oblika. Stvara puno nektara te se iz toga može zaključiti kako je malina izrazito medonosna biljka.



**Slika 7.** Cvijet maline (Izvor: [www.solnsad.ru](http://www.solnsad.ru))



### **2.3.5. Sjeme**

Sjeme maline razvije se poslije dvostruke oplodnje iz embrijske vrećice u sjemenom zametku u plodnici posebnog ili apokarpnog tučka. U čvrstoj koštici maline nalaze se nježna sjemenka, dok se u razvijenom plodu maline nalazi veliki broj sitnih sjemenki (Slika 8.). Svaka normalno razvijena sjemenka sadrži embrij ili klicu te opnu sjemenjaču. U vegetativne organe embrija ubrajaju se: korjenčić, stabalce, klicin pupoljčić i dva klicina lista, odnosno kotiledoni. Pri završetku procesa jarovizacije na niskoj temperaturi i u vlažnim uvjetima, sjeme maline počinje klijati. Sjemenjaci koji nastaju klijanjem iz sjemena mogu poslužiti za stvaranje novih i boljih sorti maline spolnim razmnožavanjem. Dva kotiledona mladog sjemenjaka maline pojavljuju se na površini zemlje. Ako su kotiledoni mladog sjemenjaka s prisustvom dlačica, zreli stadij sjemenjaka posjedovati će trnje, a kada su kotiledoni mladog sjemenjaka bez dlačica, tada će i odraslo stablo sjemenjaka biti glatko, odnosno neće sadržavati trnje i dlačice.



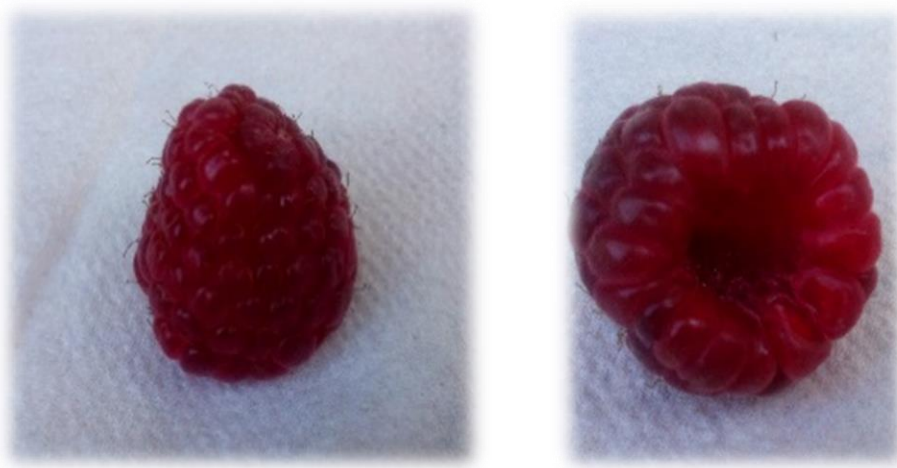
**Slika 8.** Sjemenke maline (Foto: Jaredić, 2018.)

### **2.3.6. Plod**

Plod maline je u obliku zbirne koštunice koji se sastoji od velikog broja djelomično sraslih pojedinačnih koštunica sakupljenih oko ispupčene i poluosušene cvijetne lože (Slika 9.). Zreli plod maline pri berbi se odvaja od cvijetne lože. Svaka pojedinačna koštunica maline nastaje od jednog oplodnog tučka ili karpele. U središtu tučka nalazi se sjemenka koju obavija perikarp ili omotač. Perikarp se sastoji od egzokarpa ili pokožice, mezokarpa ili mesa ploda i endokarpa ili koštice. Tanka pokožica ima ulogu koja štiti sočno i jestivo meso ploda. Osobine ploda maline ponajviše ovise o vrsti i sorti, oprašivaču i oplodnji, ekološkim uvjetima te o primijenjenoj agrotehnici. Masa ploda većine plemenitih sorti crvene maline kreće se od 3 do 6 grama. Za vrijeme kišnih godina plodovi maline su mekši, dok su sitniji i



čvršći za vrijeme suše. Plod predstavlja osnovni cilj u proizvodnji maline, a okus samog ploda maline najviše ovisi o balansu sadržaja šećera i organskih kiselina.



**Slika 9.** Plod maline (Foto: Jaredić, 2018.)

#### **2.4. Razmnožavanje maline u kulturi tkiva *in vitro***

Pri znanstvenom radu u voćarstvu, a pogotovo suvremenom rasadničarstvu, model *in vitro* razmnožavanja predstavlja najmoćnije oružje modernog istraživačkog rada s ciljem istraživanja rasta i razvoja biljaka, biokemijskih i fizioloških osobina i sekundarnih metabolita. Kultura biljnih stanica i tkiva predstavlja laboratorijski model uzgoja stanica, tkiva, organa i čitavih organizama na umjetnim hranjivim podlogama u aseptičkim (sterilnim) uvjetima. Česti sinonim za kulturu biljnog tkiva je mikropropagacija, a temelji se na totipotentnosti biljnih stanica. Sam naziv *in vitro* označava uzgoj kultura u staklenim ili prozirnim plastičnim posudama.

Prednosti *in vitro* razmnožavanja očituju se mnogo bržim razmnožavanjem u odnosu na *in vivo* razmnožavanja. Uz to, moguće je razmnožavati i one biljke koje u *in vivo* uvjetima nije moguće provesti. Mikroklonirane biljke često rastu bolje i snažnije od biljaka kloniranih *in vivo* postupkom što može biti uvjetovano činjenicom da su one zdrave i oslobođene od patogenih klica. U kulturi *in vitro* razmnožavaju se samo zdrave biljke, bilo da je riječ o spajanju sa strogom selekcijom početnog materijala ili da je riječ o tome da biljke ozdravljaju primjenom kulture *in vitro*. Tehnologija *in vitro* također se omogućava prijenos biljaka na veće, odnosno međunarodne udaljenosti. Za profesionalne proizvođače biljaka dodatne prednosti *in vitro* kulture su i nove sorte koje se mogu komercijalno brzo razmnožiti i tako pojaviti na tržištu u vrlo kratkom roku. Također, kultura *in vitro* omogućuje brže postavljanje

malih roditeljskih klonova za stvaranje F<sub>1</sub> hibrida, te oplemenjivači mogu brže postići solidne mutante poticanjem adventivnih pupova i izdanaka (Dale i Webb, 1985).

Postoje i nedostatci ove tehnike. Primjerice, genetička stabilnost u nekim sustavima *in vitro* razmnožavanja je vrlo niska. Nakon prijenosa u *in vivo* uvjete, biljke iz kulture mogu pokazivati određene loše značajke kao što su primjerice grmoliki rast kojim se nastavlja stvaranje postraničnih ogranaka ili čak potpuni povratak na početne karakteristike. Postoji mogućnost i teškog poticanja ukorjenjivanja reznica *in vitro* kod drvenastih vrsta, kao i kod klasičnih reznica. Kod nekih biljaka korijenje zametnuto *in vitro* nije funkcionalno u uvjetima *in vivo* i mora biti zamijenjeno novim korijenjem koje je prilagođeno supstratu. Mikroklonirani genotip biljaka, koji će se na kraju uzgajati u polju na otvorenome, može biti osjetljiv na bolesti i uništen od patogenog organizma koji ga je napao. Za zaštitu biljaka koje su proizvedene na *in vitro* način mogu se, a katkada i moraju primijeniti intenzivne zaštitne mjere.

Kultura tkiva (mikropropagacija) može se upotrijebiti za umnožavanje pojedinih genotipova, ali i očuvanje i uzgoj novih kultivara koje će se bolje prilagođavati specifičnim svojstvima tla i klimatskim uvjetima. Provedena istraživanja o mikropropagaciji maline 80-ih godina prošlog stoljeća bazirala su se na zamjeni uobičajenih metoda razmnožavanja te na povećanju proizvodnje bezvirusni biljaka. Metoda mikropropagacije maline zasniva se na brzom razmnožavanju maline, koja uključuje pripremu i uvođenje u kulturu, inicijacija ili proliferacija, umnožavanje ili multiplikacija, inicijaciju korijena ili rizogeneza, te na kraju prijenos biljaka u tlo ili aklimatizacija (Cousineau J.C. i Donnelly D.J. 1991).

#### **2.4.1. Uvođenje maline u *in vitro* uvjete**

Prije tehnike mikropropagacije bitno je napomenuti da postupak vegetativnog razmnožavanja sastoji se od međusobno različitih postupaka, odnosno više faza (Murashige, 1974; Debergh i Maene, 1981). Prije početka *in vitro* kulture potrebno je pravilno postupati s početnim materijalom. To podrazumijeva njegovo čuvanje u zdravom stanju, primjerice u stakleniku bez kukaca, zalijevanje samo vodom, čist pribor i posude, dobra zdravstvena zaštita, te čuvanje biljaka u relativno suhim uvjetima.

Izvorno biljno tkivo od kojega se uzimaju eksplantati i postupak primjenjivanja imaju važnu ulogu u uspješnom postavljanju mikropropagacije. Poznato je ako genetska stabilnost tkiva

varira tipovi eksplantata koji se upotrebljavaju za kulturu utjecati će na varijabilnost reprodukcije. U tom smislu preporučuje se vršni meristem zbog pružanja određene sigurnosti u odstranjivanju mikroorganizama, koji su izvor zaraze.

Postupak uvođenja maline u *in vitro* uvjete podrazumijeva sterilnu izolaciju meristema, vegetacijskoga vrška, eksplantata i drugih dijelova biljke. U slučaju prisustva unutrašnje infekcije primjenjuju se posebne tehnike. Neke od njih su identificiranje i eliminacija virusa, ponovno testiranje biljke te poduzimanje određenih mjera da se infekcija ne ponovi. U ovom postupku uvođenja maline u *in vitro* uvjete najvažnije je dobivanje sterilnog rasta eksplantata (Slika 10.).

Prije samog početka procesa sterilizacije potrebno je odstraniti sve komadiće zemlje ili mrtvih biljnih dijelova. Ukoliko je vanjska zaraženost iznimno velika materijal je izvana potrebno dobro isprati vodom. Tkivo od kojega se uzima eksplantat uranja se u 70% etanol nekoliko sekundi kako bi se odstranili mjehurići zraka, a nakon toga uranja se 10 do 30 minuta u 1 do 10% natrij-hipoklorit ( $\text{NaClO}$ ), ili u klorno vapno, odnosno svježju varikinu ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) s dodatkom nekoliko kapi deterdženta tipa Tween 20 ili Tween 80. Nakon toga eksplantat se pažljivo, obično 3 puta po 2,5 ili 15 minuta, ispire sterilnom autoklaviranom vodom. Pri završenom procesu ovakve vrste sterilizacije slijedi obrada tkiva, odnosno rezanje na odgovarajuće dijelove u sterilnim uvjetima, točnije u laminarima te sa odgovarajućim sterilnim priborom. Kako bi se utvrdila sigurnost sterilnosti eksplantata, preporučljivo je vegetacijski vršak razrezati uzdužno i staviti rezanim površinama na bogat medij koji je pripremljen s dodatkom 2 do 3% triptona ili peptona. Ukoliko je eksplantat unatoč sterilizaciji kontaminiran, u narednih nekoliko dana pojavit će se bujan mikroorganizama. Ipak, ovaj postupak ne mora uvijek pokazivati da je kultura kontaminirana iz razloga što postoje endogene bakterije za koje još uvijek nije utvrđen dobar medij kojim bi ih se moglo otkriti.



**Slika 10.** Uvođenje eksplantata maline u kulturu tkiva – *in vitro* (Foto: Bošnjak, 2018.)

#### **2.4.2. Umnožavanje ili multiplikacija maline *in vitro***

Glavna svrha umnožavanja, odnosno multiplikacije maline u *in vitro* uvjetima je postizanje razmnožavanja bez gubitka genetičke stabilnosti (Slika 11.). Umnožavanje se može obavljati na različite načine, kao što je kulturom pojedinačnih nodija, metodom aksilarnog pupanja, aksilarnog grananja, te metodom aksilarnog izdanka i ostalo.

Kultura pojedinačnih nodija podrazumijeva izolaciju pupa zajedno s komadićem pripadajuće stabljike radi poticanja razvitka izdanka. Ta metoda je najprirodnija metoda vegetativnog razmnožavanja biljaka *in vitro* jer se primjenjuje i *in vivo*. Svaki pup koji se nalazi u pazušcu lista, također i vršni pup može se odvojiti od biljke i kultivirati na hranidbenoj podlozi radi poticanja njegova razvoja u izdanak. Na novoformiranoj stabljici pupovi u pazušcima listova ponovno mogu biti subkultivirani za ponovni razvitak stabljika te se iz njih postupak može neprestano ponavljati. Ova tehnika ne zahtijeva dodavanje citokinina za prekid apikalne dominacije.

Metoda aksilarnog pupanja slična je prethodno opisanoj metodi pojedinačnih nodija. Najveća razlika između navedenih dvaju metoda je da se kod pojedinačnih nodija primjenjuje isključivo izduživanje stabljike te dodavanje citokinina gotovo da i nije potrebno ili ako se dodaje onda je to tek u malim koncentracijama. Metodom aksilarnog pupanja izolira se vegetacijski vršak i na podlozi s relativno visokom koncentracijom citokinina inducira se rast pupova u pazušcima listova. Otkrićem citokinina došlo je do zaključka da apikalna dominacija može biti prekinuta i bez otkidanja vrška ako se primjeni citokinin. Kada se izdanci razviju, postoji mogućnost presađivanja na svježju podlogu i postupak se može ponavljati dok se ne postigne traženi broj izdanaka koji se zatim ukorjenjuju i prenose u zemlju.

Metoda aksilarnog grananja do danas je primijenjena na mnogim biljnim vrstama (Hu i Wang, 1983.) a odlikuje se po brzom razmnožavanju novih podloga i sorti te postavljanju zdravog materijala, kao i po razmnožavanju sorti s vlastitim korijenskim sustavom što isključuje cijepljenje, čime se smanjuju troškovi radnog vremena. Također, kod ove metode razmnožavanje ne ovisi o sezoni i omogućava čuvanje biljnog materijala pri niskim temperaturama do trenutka sadnje, bilo da je riječ vani ili u stakleniku.

Metoda aksilarnog izdanka postala je najvažnija metoda u razmnožavanju u praksi *in vitro*, posebno kod rozetastih biljaka. Razlog tome je upravo zbog toga što je ta metoda općenito

jednostavnija od drugih metoda, ima relativno visoku stopu umnožavanja, uglavnom je najčešće očuvana genetička stabilnost.

Treba istaknuti da je kod ove metode rast tako dobivenih biljaka vrlo dobar, bilo da je riječ o rezultatu rejuvalizacije ili njihova vrlo dobra zdravstvena stanja.



**Slika 11.** Multiplikacija eksplantata maline *in vitro* (Foto: Bošnjak, 2018.)

#### **2.4.3. Ukorjenjavanje maline u *in vitro* uvjetima**

Proces ukorjenjivanja maline u *in vitro* uvjetima podrazumijeva pripremu izdanaka ili biljaka dobivenih iz faze umnožavanja ili multiplikacije kako bi se kasnije omogućio prijenos biljaka u zemlju (Slika 12.). To može uključivati zaustavljanje stvaranja aksilarnih izdanaka ili početak izduživanja izdanaka. Oblikovani izdanci fizički se odvajaju i obično pojedinačno prenose na podlogu za zakorjenjivanje. Obično se u podlogama smanjuje ili čak potpuno odstranjuje citokinin.

Pri mikrorazmnožavanju pojedinačnim nodijima, aksilarnim grananjem ili regeneracijom adventivnih izdanaka, ukoliko je cilj dobiti potpunu i funkcionalnu biljku, potrebno je dobiti izdanak ili presadnicu zakorijeniti. Prema tome, indukcija korijenja je vrlo važan proces u proizvodnji maline kulturom *in vitro*. Starost i razvojni stadij biljke, mjesto na biljci s kojega se uzima eksplantat, pozicijski efekt, veličina eksplantata, kisik, svjetlost, temperatura samo su neki od čimbenika koji mogu utjecati na zametanje i rast korijena *in*



*vitro*. Primjerice prisutnost kisika ima veoma važnu ulogu u ukorjenjavanju. Izdanci se bolje ukorjenjavaju u *in vivo* nego u *in vitro* uvjetima. Razlog tomu je jer u agarskoj podlozi nema dovoljno kisika jer agar nije dovoljno topljiv u vodi. Korijenje koje se stvara u agarskoj podlozi nije uvijek dobro razvijeno i u tom slučaju bolje je upotrijebiti tekuću, odnosno mirniju podlogu. U stručnoj literaturi se navodi da je za poticanje boljeg izduživanja zametnutih izdanaka kao i poticanje adventivnog ukorjenjavanja, bez prenošenja na medij za zakorjenjivanje, osiromašeni agarski medij nadopunjava se svježim tekućim (Maene i Debergh, 1985).

Također, bitnu ulogu ima i svjetlost pri ukorjenjavanju. U stručnoj literaturi navodi se da svjetlost općenito ima negativan utjecaj na zametanje korijenja. Dokazano je da biljke koje su rasle u mraku, drugim riječima etiolirane biljke, lakše su stvarale korijen od biljaka koje su rasle na svjetlosti (Hammerschlag, 1982).

Za poticanje adventivnog korijenja, nakon što su se izdanci u *in vitro* kulturi razvili u prisutnosti citokinina, oni se prebacuju na podlogu bez citokinina s egzogenom dodanim auksinom. Naime, istraživanja pokazuju da bi utjecaj etilena mogao biti uključen u procesu ukorjenjivanja. Također, otkriveno je da su oligosaharidi nova skupina tvari koje imaju regulatorne funkcije u ukorjenjivanju (Alberhiem and Darvill AG, 1984).



**Slika 12.** Ukorjenjavanje/rizogeneza eksplantata maline *in vitro* (Foto: Bošnjak, 2018.)

#### **2.4.4. Aklimatizacija maline u uvjetima *ex vitro***

Malina nastala u *in vitro* uvjetima mora se pripremiti na prijenos u vanjske uvjete, što se može početi već u uvjetima *in vitro*. Taj postupak naziva se aklimatizacija ili jačanje biljčica. Aklimatizacija se postiže tako da se biljčice postupno privikavaju na smanjenje relativne atmosferske vlažnosti. Jedna od bitnih stavki u postupku aklimatizacije je pravilan razvitak stomatalnog aparata. Što se atmosferska vlažnost više smanjuje, bolje će se razvijati kutikularni voštani slojevi koji će sprječavati kutikularnu transpiraciju.

Aklimatizacija *in vitro* postrojenja u stakleničkim uvjetima može biti kritična faza tijekom mikropropagacije. Malina za *in vitro* proizvodnju mora biti u stanju ispuniti fiziološke zahtjeve koji omogućuju njihovu primjenu u autotrofnom životu. Jedno od važnih obilježja je posjedovanje visokokvalitetnog korijena koje može dati vodu listovima koji često još nemaju potpuno razvijenu funkciju stoma i manje su zaštićeni epidermalnim slojem voska. U stočnoj literaturi provedena su istraživanja o korelaciji između broja i duljine korijena i aklimatizaciji i rasta mikro biljaka (Van Telgen et al., 1992; De Klerk, 2000).

Biljke iz *in vitro* uvjeta često imaju slabo razvijenu kutikulu i njezin voštani sloj što je posljedica visoke atmosferske vlage u posudama za kultiviranje (često oko 90-100 %). Taj nedostatak uzrokuje veliki gubitak vode isparavanjem kroz kutikulu kada se biljčice prenesu u zemlju gdje je atmosferska vlaga znatno niža. Biljke koje su rasle u *in vitro* uvjetima utvrđena je slabija vaskularna povezanost između korijena i izdanka, što također može dovesti do smanjenja regulacije vode. Također, u *in vitro* uvjetima biljke su još uvijek heterotrofne te je neophodan prelazak na fototrofni način života, točnije moraju početi same normalno fotosintetizirati, nakon prijenosa u zemlju što za njih predstavlja određeni stres (Becana i sur., 1998).

Uvjeti visoke vlažnosti u postupku aklimatizacije biljaka mogu se postići u stakleniku koji ima mogućnost opskrbe uređaja za fino orošavanje, ili pak stvaranja maglice (misteri i fogeri) čime se postiže kontrolirana atmosferska vlažnost (Slika 13.). U toj fazi biljke su podvrgnute slaboj osvjetljenosti i nižoj temperaturi. Postoji još jedan način aklimatizacije, a taj je da se epruvete ili staklenke ostavljaju otvorene nekoliko dana u sterilnim uvjetima dok se biljka ne prilagodi vanjskim uvjetima. Biljke je moguće prskati antitranspirantima čije djelovanje smanjuje isparavanje *in vivo*, ali ova metoda ponekad nema povoljan učinak te iz tog razloga nema široku primjenu.

Ponekad je prilagodba na vanjske uvjete rasta otežana zbog slabog razvitka korijenja. Poznato je da korijenje koje se zametnulo i razvilo u *in vitro* uvjetima u mnogo slučajeva bude ranjivo i ne pokazuje pravilno funkcioniranje u uvjetima *ex vitro* zbog nedostataka stvorenih korijenovih dlačica. Korijenje brzo ugiba i mora biti zamijenjeno korijenjem koje se stvara u zemlji ili u odgovarajućem supstratu. Posljedica slabo razvijenog korijenskog sustava dovodi do onemogućavanja daljnjeg rasta biljčica presađenih u zemlju.

Ukoliko se utvrdi da je prilagodba biljke na vanjske uvjete otežana zbog slabog razvitka korijenja, potrebno je poduzeti mjere oko izbjegavanja zaraze gljivicama i bakterijama, s tim da se agarska podloga u sastavu sa šećerom dobro ispere i odstrani, zatim da se upotrijebi sterilizirana zemlja. Sterilizacija zemlje postiže se parom ili djelotvornim gamma-zračenjem. U praksi se u industrijskom mikrokloniranju rijetko kad upotrebljava sterilizirana zemlja, zapravo više se primjenjuju različiti fungicidi i slična sredstva. Sve patogene klice potrebno je uništiti neposredno nakon prijenosa biljaka u zemlju jer su biljčice vrlo neotporne. Za sprečavanje oštećena korjenova sustava preporučuje se biljčice saditi u fino prosijanu zemlju ili supstrat. Istraživanja su dokazala da je za preživljavanje biljaka nakon prijenosa u zemlju dobro ako se ukorjenjavanje postigne na podlozi koja je siromašna solima. Uz sve navedene postupke, povoljno djeluje i primjena hladnog postupka u trajanju od 4 do 8 tjedana na 5 °C *in vitro* ili neposredno nakon prijenosa u zemlju čime se prekida dormanca.

U industrijskom svijetu primjene kulture biljnoga tkiva u postupcima aklimatizacije sve više se primjenjuju sistemi orošavanja ili stvaranja magle. Također, iz dana u dan na tržištu se pojavljuju novi supstrati koji omogućavaju bolje preživljavanje i uspješniji uzgoj biljčica proizvedenih u *in vitro* uvjetima. Ti postupci su od iznimne važnosti iz razloga što se time smanjuje cijena pojedinačne presadnice koja u nekim slučajevima može biti skuplja od one proizvedene na klasičan način.



**Slika 13.** Aklimatizacija maline FAZOS (Foto: Bošnjak, 2018.)



#### **2.4.5. Princip propagacije maline uporabom suvremenih TIB/TIS sustava bioreaktora**

Konvencionalna metoda temelji se na korištenju polučvrstog i čvrstog (agar) medija, a primjenjuje se prvenstveno zbog svoje jednostavnosti i niskih troškova. Međutim, takvu vrstu tehnike teško je automatizirati, iziskuje i visoke troškove u proizvodnje što konvencionalni sustav čini manje prikladnim za masovnu proizvodnju velikih razmjera. Velika količina potrebnog rada je glavni nedostatak konvencionalne metode. Posljednjih godina razvijene su nove suvremene tehnologije koje smanjuju vrijeme potrebno pri rukovanju s biljnim materijalom i ostalom konvencionalnom opremom, a istodobno povećavaju stopu umnožavanja, odnosno multiplikacije biljaka i samu kvalitetu biljnog materijal ali i proizvodnog sustava.

Proizvodnja maline u cilju što brže proizvodnje posljednjih godina vrlo je popularna među istraživačima. Od posebno je značenja razvoj suvremene tehnologije koji omogućava masovno razmnožavanje i proizvodnju maline u automatiziranim bioreaktorima koji sadrže tekući hranjivi medij. Sustav bioreaktora s tekućim medijem koristi se za masovnu proizvodnju i istraživanje ne samo maline nego i ostalih hortikulturnih biljaka (Levin i Vasil, 1989).

Bioreaktor suvremene generacije je samostalni, sterilni uređaj s kontrolom mikroklimatskih uvjeta koji putem zračnog sustava (pneumatika) pumpa ili ispumpava tekući hranjivi medij na ili s biljnog materijala namijenjenog intenzivnoj proizvodnji, odnosno istraživanju (Paek i sur., 2005). Može poslužiti i u razvoju tekućih kultura pri čemu je moguće vršiti kontrolu i modifikaciju pojedinih parametara poput temperature, kisika, CO<sub>2</sub> koncentracije, pH, itd. Uvjete unutar bioreaktora kao što su brzina strujanja zraka ili pojedinog plina, temperatura, pH, razinu otopljenog kisika te brzina miješanja i brzinu strujanja, valja pomno pratiti i kontrolirati te ih je moguće pojedinačno optimizirati (Heyerdahl i sur., 1995). Pojedini bioreaktorski sustavi mogu pumpati medij, zrak ili ostalo iz jednog bioreaktora u slijedeći bioreaktor bez opasnosti od kontaminacije (koriste razne sustave filtera).

Bioreaktori namijenjeni za biljne vrste mogu se podijeliti na one u kojima su biljke kontinuirano potopljene u hranjivi medij, one u kojima su djelomično potopljene u hranjivi medij i one u koje su povremeno, odnosno privremeno ciklusno potopljene u hranjivi medij.

Svi bioreaktori koji se koriste u mikropropagaciji mogu se klasificirati u četiri slijedeće kategorije pokretanja:

- bioreaktori mehaničkog sustava
- bioreaktori pneumatskog sustava
- bioreaktori zatvorenog sustava (kemijske reakcije)
- bioreaktori sustava povremenog uranjanja ili imerzije – imerzni (TIB/TIS sustav)

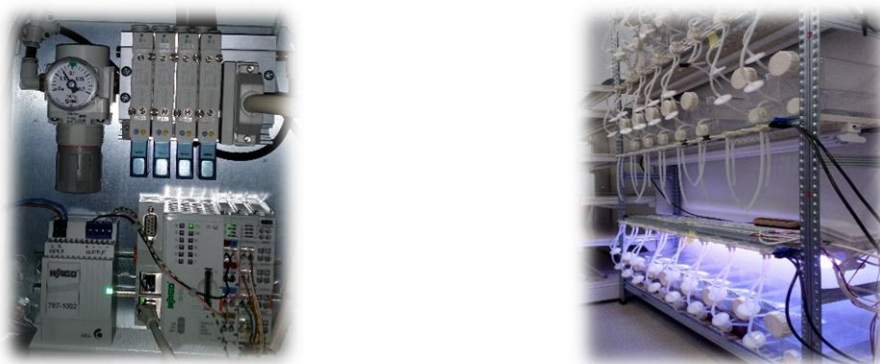
Mehanički sustavi predstavljaju bioreaktore pokretanih pomoću zraka, rotirajućih bubnjeva i spin-filtera. Pneumatski sustavi predstavljaju bioreaktore pokretane dizanjem zraka (air-lift), pomoću stupca mjehurića (bubble column) i jednostavnom aeracijom. Bioreaktori zatvorenog sustava koriste plinovitu fazu (kemijske reakcije), membrane propusne za kisik te bioreaktore s aeracijom i perfuzijom (prelijevanjem, protokom). Imerzni bioreaktori TIB (*engl.* „Temporary Immersion Bioreactor“) predstavljaju bioreaktore nove generacije (Slika 14.). Prvi TIB/TIS sustav (*engl.* Temporary Immersion System) razvili su Harris i Mason 1983. godine prošlog stoljeća. Glavne prednosti navedenog sustava su visoka učinkovitost te skraćeni ciklus reprodukcije klonskog materijala. Uz navedene prednosti ubrajaju se još i smanjenje troškova primjene medija (agar) kao i ušteda električne energije, poboljšana multiplikacija kao i smanjenje za dodatnom radnom snagom. Biljke proizvedene u takvom sustavu odlično se prilagođavaju aklimatizaciji u *ex vitro* uvjetima te je odlična adaptibilnost transplantiranih biljaka *in vivo*. Visoka automatizacija ovakvog sustava i mogućnost masovne proizvodnje biljaka osigurava odlične uvjete na tržištu velikim tvrtkama. Osim toga, garantirana je i deklarirana kvaliteta repromaterijala za europske voćare po pristupačnim cijenama. Iako je TIB tehnologija još uvijek relativno mlada i tehnologija u razvoju, sve više se radi na primjeni ovog sustava u laboratorijima za komercijalni uzgoj sve većeg broja biljnih kultura (Stanisavljević i sur., 2017 i 2018.). Sustav se sastoji od fizički odvojenih posuda s biljkama i posudama s hranjivim medijem koji pomoću pneumatike i zadanog ciklusa povremeno potapa biljni materijal u cilju podmirenja svih životnih potreba. Slični sustav koristi se i u humanoj medicini za uzgoj tkiva i/ili pojedinih organa za transplantaciju. U farmaciji za proizvodnju sekundarnih metabolita i biomase. (Slika 14.)



**Slika 14.** Imerzni bioreaktor - posuda za biljke (gornja) i za medij (donja)

(Izvor: <http://www.setis-systems.be>)

Jedna od važnih komponenti TIS sustava je računalna kontrolna upravljačka jedinica – CPU i pneumatska jedinica (kompresor). Pneumatska jedinica mora stvarati vrlo čisti i ne kontaminirani suhi zrak. Veza između pneumatskih elemenata i upravljačke jedinice mora biti savršena kako bi rad bioreaktora bio vrlo precizan i kontroliran. Pomoću kontrolne jedinice automatizira se sam proces i frekvencija, te se odvija kontrola pojedinih faza imerzije, ventilacije, upuhivanja raznih plinova, rasvjete, pH, temperature, optimizacija i smanjenje potrošnje zraka, itd (Slika 15.). Također omogućuje se stvaranje i spremanje svojih vlastitih programa (setup) i sigurnosnih kopija, kao i internetski pristup bazi za kontrolu s bilo kojeg mjesta u svijetu.



**Slika 15.** TIB sustav na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek – Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo – lijevo kontrolna jedinica, desno TIB sustav bioreaktora (Foto: Bošnjak, 2018.)

Princip propagacije maline uporabom suvremenih TIB/TIS sustava bioreaktora zasniva se na proizvodnji visoko kvalitetnih biljaka u kraćem vremenskom periodu. Sam postupak propagacije maline je relativno složen. Najviše od svega treba voditi računa o sterilnim uvjetima u kojima se postupak odvija. Bioreaktore, koji su prethodno sterilizirani u autoklavu kao i sav potreban pribor, stavlja se u zaštićeni prostor gdje će se propagacija provesti, točnije u prostor laminara. Biljčice maline također se stavljaju u prostor laminara i vade se iz staklenki u kojima su uzgojene na klasičnoj podlozi (agar) te se obavlja multiplikacija. U bioreaktor stane oko 200 multipliciranih biljaka. Kada proces ubacivanja biljaka završi, slijedi raspoređivanje maline unutra posude kako bi se što pravilnije mogle razvijati u daljnjem ciklusu proizvodnje. Bioreaktor sa biljkama se zatvara te se spaja pomoću sterilnih filtera i silikonskih cjevčica s drugom posudom koja sadrži tekući medij. Sve spomenute radnje obavljaju se isključivo unutar prostora laminara. Kada su bioreaktori pravilno zatvoreni i spojeni odnose se iz prostora laminara na postolje police za bioreaktor

(rack), odnosno klima komoru za rast gdje će se pomoću kompjuterskog sustava (CPU) programirati i usmjeriti daljnji ciklus rasta i razvoja. Kontrolnim sustavom programira se idealna frekvencija potapanja biljnog materijala hranjivim medijem nekoliko puta na dan. Prve rezultate rasta maline u bioreaktorima moguće je vidjeti već nakon par dana, dok je svega otprilike 7 do 14 dana potrebno da se dobiju nove umnožene biljke spremne za daljnji proces propagacije.

## 2.5. Dosadašnja istraživanja na malini

Prvi zapisi o istraživanju na malini putem *in vitro* kulture objavljeni su 1978. godine (Broome i Zimmerman, 1978; Harper, 1978). Do danas mnogo autora iznosi uspješne protokole za proliferaciju, multiplikaciju, ukorjenjavanje (rizogenezu) i aklimatizaciju *in vitro* maline (Broome i Zimmerma 1978; Gonzalez i sur., 2000; Debnath 2004; Jafari Najaf-Abadi i Hamidoghli 2009; Wu i sur., 2009). O mikropropagaciji *Rubus* vrste pomoću plastičnog air-lift bioreaktora s kontinuirano potopljenim biljnim materijalom prvi nas izvještava Debnath (2007) na nordijskoj kupini (cloudberry, *R. chamaemorus*). Debnath (2010) razvija protokol za *in vitro* malinu uporabom suvremenog bioreaktor TIB sustava (model RITA®). Čileanska grupa istraživača na čelu s Arencibia D. A., 2013. godine navode vrlo uspješne rezultate na kultivarima Heritage, Meeker i Amity dobivenih u TIB sustavu s dodatkom 550 ppm CO<sub>2</sub>; intenzitet svjetlosti 80  $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  i reduciranoj koncentracije sukroze od 15 g/l. Stanisavljević i sur. (2017. i 2018.) na Fakultetu za agrobiotehničke znanosti Osijek aktivno istražuju mikropropagaciju pojedinih kultivara maline ali i ostalih voćnih vrsta putem klasičnog modela i suvremenog TIB sustava SETIS®. Cilj istraživanja bio je utvrditi antioksidativni odgovor analizom tkiva malina proizvedene u na konvencionalni način (kontrola) i kroz TIB sustav. Na kontrolnom tretmanu utvrđena razina lipidne peroksidaze (indikator stresa) je značajno viša u odnosu na tretmane iz TIB sustava. Međutim, nema značajne razlike u ukupnom sadržaju fenola i ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti između tretmana.

Anorganske mineralne soli glavne su komponente medija u kulturi tkiva koje igraju vrlo važnu ulogu u rastu i razvoju biljaka (Murashige i Skoog 1962; Anderson 1980.) U mikropropagaciji maline obično se koriste MS, DKW, AS, WPM formulacije medija i njihove modifikacije (Reed 1990; Tsao i Reed 2002; Zawadzka i Orlikowska 2006b; Wu i sur., 2009.). Rezultati u rastu i razvoju na pojedinim medijima variraju, odnosno rezultiraju

neoptimalnim razvojem ne samo maline nego i ostalih pojedinih voćnih vrsta (Ružić i sur., 2000; Dantas i sur., 2001; Greenway i sur., 2012; Reed i sur., 2013a; Poothong i Reed 2014.)

Posljednja istraživanja na malini govore kako čak pojedini mediji nisu optimalni za pojedine kultivare unutar vrste, odnosno ne pružaju im optimalni učinak mineralne ishrane. Optimizacija medija za malinu osigurala bi bolju komercijalnu produkciju mnogih vrsta i kultivara iz roda *Rubus*. Određivanje najvažnijih mineralnih komponenti u *in vitro* uzgoju vrlo je složeno zbog kompleksnosti interakcije između pojedinih hraniva (Niedz i Evens 2007; Reed i sur., 2013b.).

Poothong i Reed 2014. navode kako su najčešća poboljšanja na biljnom materijalu rezultat istraživanjima modifikacije dušičnih komponenti i hraniva iz mezo grupe makro hraniva ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ ). Komponente iz mezo grupe predstavljaju esencijalne komponente molekula Ca, Mg, S, P i K u biljnim stanicama (Ramage i Williams 2002.). Kalij je potreban u regulaciji osmotskog balansa te otvaranju i zatvaranja stoma. Magnezij i fosfor su kofaktori u fosforilacijskim reakcijama, a magnezij je centralna molekula klorofila. Sumpor je potreban za pretvorbu nitrata u određene aminokiseline te je involviran u produkciji klorofila. Kalcij je potreban za sintezu stanične stijenke, a kalcijev pektat je ugrađen u središnju lamelu te igra važnu ulogu kao sekundarni prijenosnik u regulaciji staničnih procesa. Stoga deficit ili suficit ovih hraniva uzrokuje simptome usporenog rasta, toksičnosti, hiperhidričnosti i kloroze (Epstein i Bloom 2005; Bairu i sur., 2009; Ivanova i Van Staden 2009; Reed i sur., 2013a.) Neki kultivari maline pate od teške kloroze u *in vitro* uvjetima na pojedinim medijima, a intenzitet se povećava s trajanjem subkultivacije. Povoljni učinci FeEDDHA u *in vitro* kulturi pripisuju se visokoj stabilnosti kelatnog oblika željeza koji omogućuje usvajanje i održavanje konstantne početne ionske ravnoteže u mediju (Shibli i sur., 2002). Drugi oblici željeza kao npr. kelat FeNaEDTA predstavlja dosta nestabilan oblik (fotolabilan), a slobodni ioni željeza stvaraju aktivni kisik koji izazva destrukciju mnogih komponenti u mediju (Dunlap i Robacker, 1988; Becana i sur., 1998.). Slobodni ioni željeza mogu se taložiti u nepristupačne oblike Fe-fosfata, dok EDTA može inducirati produkciju formaldehida koji je vrlo toksičan za biljni materijal (Hangarter i Stasinopoulous, 1991.). Optimalna koncentracija i formulacija željeza u *in vitro* uzgoju može biti povezana s aktivnosti peroksidaze i katalaze koje utječu i na metabolizam auksina (Molassiotis i sur., 2004.). Najstabilniji kelat FeEDDHA ne ometa metabolizam auksina te ne producira reaktivne oblike kisika (Becana i sur., 1998.).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija za kulturu tkiva

Cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnost optimizacije i standardizacije protokola mikropropagacije maline uporabom imerznih bioreaktora (TIS/TIB) nove generacije koji koriste sustav povremene imerzije biljnog materijala uz modifikaciju mineralnih komponenti medija.

Cjelokupno istraživanje provedeno je u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva u sklopu Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (laboratorij za voćarstvo) na Fakultetu agrobiotehičkih znanosti Osijek. U sklopu laboratorija vrše se mnoga istraživanja na raznim voćnim vrstama (malina, orah, borovnica, paulovnia, lijeska, vegetativne podloge za trešnju, višnja, goji, itd.).

Katedra se bavi znanstvenim istraživanjem (razvijanje i poboljšanje protokola u cilju razvoja oplemenjivačkog i selekcijskog rada u voćarstvu), edukacijom studenata, proizvodnjom sadnog materijala i sekundarnih metabolita. Laboratorij posjeduje svu opremu potrebnu za uspješno provođenje mikropropagacije (laminarni stol/kabinet, autoklav, miješalica, pH metar, sterilizator, pincete, skalpeli, teglice, TIB SETIS<sup>®</sup> sustav bioreaktora, itd), matični biljni materijal (matičnjak – prijavljen u centru za rasadničarstvo HCPHS), prostor za aklimatizaciju, klima komoru s kontroliranim uvjetima potrebnim za razvoj biljaka u pojedinim fazama mikropropagacije (Slika 16.).



**Slika 16.** Klima komora s biljnim materijalom, matičnjak i prostor za aklimatizaciju - FAZOS (Foto: Bošnjak, 2018.)

### 3.2. Biljni materijal

U ovom istraživanju korišten je biljni materijal uveden u kulturu tkiva prethodnih godina na kojem se vrše istraživanja druge tematike. Radi se o relativno novoj sorti maline.

Himbo Top<sup>®</sup> je dvorodna sorta koja je nastala križanjem sorti Atumno Blise x Himbo Queen u Švicarskoj (Slika 17.). U prvoj godini nakon sadnje izdanci maline postižu visinu od 1,8 m, a formira izbojke koji nisu odveć bujni, ali uvijek dovoljno razgranati za dobar urod.

Pokazuje vrlo visoku otpornost na Phytophthoru, koja inače u uzgoju malina predstavlja velik problem i uvjetuje brzo propadanje malinjaka. Plodovi joj dozrijevaju krajem srpnja ili početkom kolovoza, a dozrijevanje, odnosno berba, traje 6 do 8 tjedana (katkada i duže). Vrlo je rodna sorta. Plod je velik, srednje čvrstoće, svijetlocrven, atraktivan. Plodovi su vrlo izraženog osvježavajućeg slatko-kiselkasta okusa s lagano izraženom kiselinom, što mnoge druge sorte nemaju. Prikladna je za potrošnju u svježem stanju, za slastičarne, sladoled, deserte, itd. Uzgaja se na dobro dreniranim propusnim tlima, korijen osjetljiv na suvišnu vlažnost tla. Preferira tla bogata humusom (organskom tvari).

Sadnja se obavlja na razmak između redova od 2,5 do 3 m, a u redu od 0,4 do 0,5 m. Zbog obilne rodnosti treba primijeniti armaturu. Ako se uzgaja u plastenicima, tada je moguće osjetno produžiti vrijeme berbe. Budući da je sorta Himbo Top<sup>®</sup> vrlo bujna, treba biti oprezan pri gnojdbi. Ne smije se pretjerati s uporabom dušičnih gnojiva. Uz veće količine gnojiva plodovi su nešto lošije kvalitete. Treba još istaknuti da Himbo Top<sup>®</sup> kao dvorodna sorta donosi plodove i na izbojcima koji su narasli u istoj godini, a ne samo na ograncima prošlogodišnjih izbojaka ili šiba. Himbo Top<sup>®</sup> je oplemenjena sorta, boljih svojstava od ranijih dvorodnih sorti. Uložena financijska sredstva za podizanje malinjaka brzo se otplaćuju jer sorta vrlo obilno rodi.

Ovdje želimo istaći da je sorta pod patentom, pa je svako razmnožavanje u svrhu prodaje sadnog materijala zabranjeno. Kupljene sadnice mogu se koristiti samo za vlastite potrebe u proizvodnom malinjaku. Pravo na razmnožavanje stječe se otkupom licence. Sorta je registrirana u Švicarskoj pod brojem 481-664, a međunarodno pod brojem 752-754. Registracija je uvedena u registar sorti Europske unije.





**Slika 17.** Izgled plodova licenciranog kultivara Himbo Top®

(Izvor: <https://www.njuskalo.hr>)

### **3.3. Tretmani u istraživanju**

U istraživanju su korištene hranjive podloge MS i DKW s različitim kelatnim oblicima željeza. Tretman s modificiranom MS podlogom (MS(m)) sadržavao je kelatni oblik željeza FeEDDHA. Tretman DKW FeNaEDTA sadržavao je standardnu formulu DKW podloge s kelatnim oblikom željeza FeNaEDTA, te tretman DKW FeEDDHA standardnu formulu DKW podloge s kelatnim oblikom željeza FeEDDHA (Tablica 1.).

Također učinjena je i komparacija svih tretmana unutar konvencionalnog *in vitro* modela proizvodnje koji koristi polučvrsti medij i suvremenog imerznog TIB sustava koji koristi tekući hranjivi medij (Slika 18.). Također je učinjena i komparacija između ova dva primijenjena sustava proizvodnje (*in vitro* konvencionalni i suvremeni TIB sustav) međusobno.

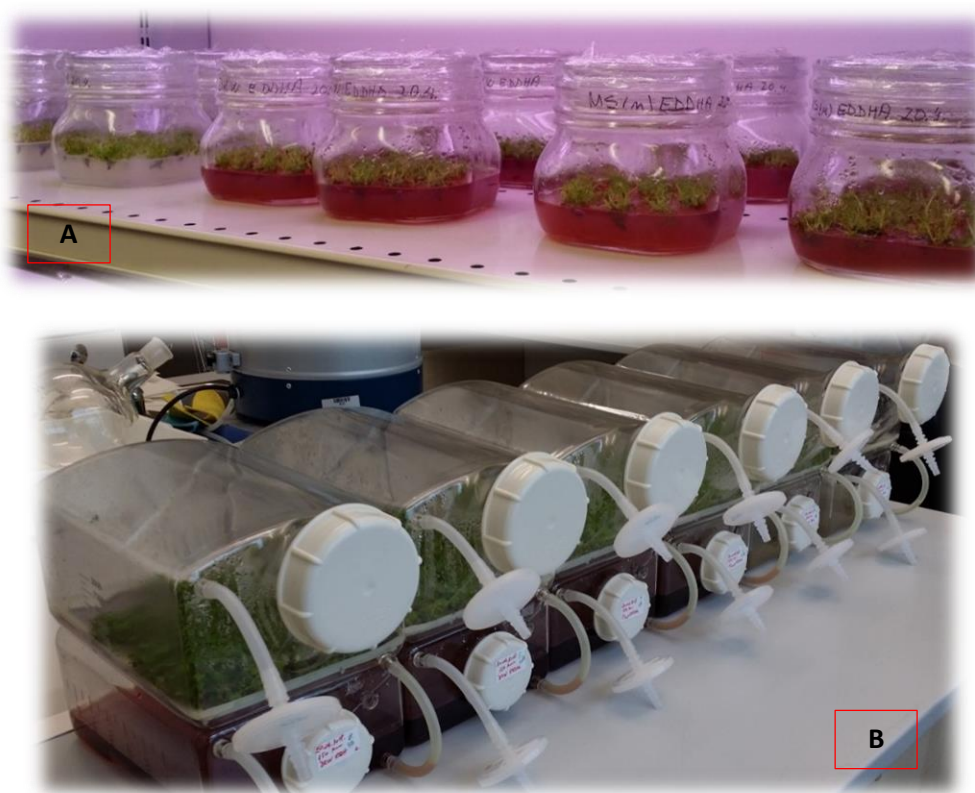
Sva oprema, pincete, skalpeli, teglice, filteri, crijeva, pribor, posude te medij korišten u istraživanju sterilizirani su u autoklavu na 121 °C u trajanju od 20 minuta pri tlaku od 1,2 bara. Radni prostor unutar laminarne komore sterilizira se 70 % etanolom te tretirana UV lampom u trajanju od 30 minuta. Svaki bioreaktor je napunjen s 1 litrom medija, a svaka teglica sa 100 ml medija nakon čega se pristupilo autoklaviranju pri navedenom režimu.

Na svim hranjivim podlogama pH je podešena prije autoklaviranja na vrijednost od 6,0 pH (optimum za malinu od 5,7 do 6,3). Tretmani na tekućem mediju nisu sadržavali agar pošto se on koristi kao zgušnjivač u konvencionalnom modelu proizvodnje na polučvrstom mediju (kontrolni tretman).

Nakon završetka svi tretmani (teglice i bioreaktori) postavljeni su u klima komoru pod fotoperiod svjetlosti 16/8 i temperaturu od 23 °C.

**Tablica 1.** Tablični prikaz tretmana u istraživanju.

| Medij | Kelatni oblik željeza | Sustav i konzistencija medija                     |
|-------|-----------------------|---------------------------------------------------|
| MS(m) | FeEDDHA               | <i>Polučvrsti (konvencionalni) / Tekući (TIB)</i> |
| DKW   | FeNaEDTA              | <i>Polučvrsti (konvencionalni) / Tekući (TIB)</i> |
| DKW   | FeEDDHA               | <i>Polučvrsti (konvencionalni) / Tekući (TIB)</i> |



**Slika 18.** Tretmani u istraživanju – konvencionalni (A) i imerzni TIB sustav (B)  
(Foto: Bošnjak, 2018.)

### 3.3.1. MS modificirani medij (MSm)

MS (Murashige & Skoog) najčešće je korišten medij u kulturi tkiva od kojeg su se razvile mnoge varijacije. U istraživanju je modificiran samo sastav MS makro elemenata mezo grupe, odnosno povećana je koncentracija  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  i  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  za 3 puta te je korišten kelatni oblik željeza FeEDDHA umjesto standardnog FeNaEDTA. Ostali MS makro elementi, agar, sukroza ostali su nepromijenjeni (standard - Duchefa). Od hormon rasta korišten je citokinin BAP (6-Benzylaminopurine) i auksina IBA (Indole-3-butyric acid), a umjesto MS vitamina, korišten je WMP (McCown Woody Plant medium) formulacija vitamina. U medij je također dodan i PPM (Plant Preservative Mixture) u svrhu prezervacije biljnog materijala od kontaminacije tijekom istraživanja. Detaljni sastav hranjive podloge MS(m) opisan je u tablici 2.

**Tablica 2.** Sastav hranjive podloge MS(m) u istraživanju (tretman MSm FeEDDHA).

| Makro mineralne soli     | (mg/l)  | Mikro mineralne soli                                 | (mg/l) | Organski i ostali dodatci | (mg/l)   |
|--------------------------|---------|------------------------------------------------------|--------|---------------------------|----------|
| $\text{CaCl}_2$          | 996,06  | $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$            | 16,90  | Agar                      | 6500,00  |
| $\text{KNO}_3$           | 1900,00 | $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$           | 8,60   | Saharoza                  | 30000,00 |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 510,00  | $\text{H}_2\text{BO}_3$                              | 6,20   | Glicin                    | 2,00     |
| $\text{MgSO}_4$          | 541,62  | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,25   | Myo-inositol              | 100,00   |
| $\text{NH}_4\text{NO}_3$ | 1650,00 | $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$           | 0,025  | Nikotinska kis.           | 0,50     |
|                          |         | $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$          | 0,025  | Piridoksin HCl            | 0,50     |
|                          |         | KI                                                   | 0,83   | Tiamin HCl                | 1,00     |
|                          |         | FeEDDHA                                              | 118,00 | PPM                       | 2ml      |
|                          |         |                                                      |        | BAP                       | 0,8ml    |
|                          |         |                                                      |        | IBA                       | 0,01ml   |
|                          |         |                                                      |        | pH                        | 6,0      |

### 3.3.2. DKW medij

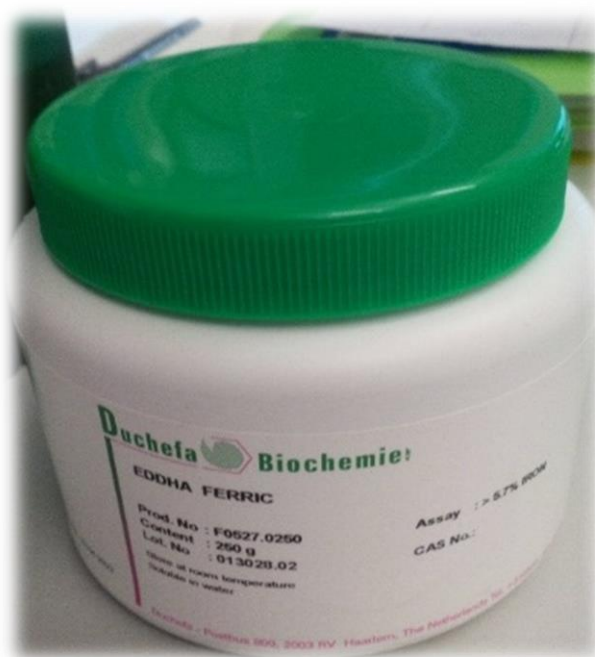
DKW (Driver i Kuniyuki Walnut, *engl.* walnut = orah) medij sadrži makro i mirkonutrijente te vitamine. Ova varijanta medija uključivala je 2 tretmana u kojima su mikro, makro elementi, vitamini, hormoni, agar, sukroza ostali isti samo je kelatni oblik željeza u svakom tretmanu drugačiji (DKW s kelatom FeNaEDTA i DKW s kelatom FeEDDHA). Detaljni sastav hranjive podloge DKW opisan je u tablici 3.

**Tablica 3.** Sastav hranjive podloge DKW u istraživanju (tretmani DKW FeEDTA i tretman DKW FeEDDHA).

| Makro mineralne soli                                  | (mg/l)  | Mikro mineralne soli                                 | (mg/l) | Organski i ostali dodatci | (mg/l)   |
|-------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------|--------|---------------------------|----------|
| CaCl <sub>2</sub>                                     | 112,50  | CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O                | 0,25   | Agar                      | 6500,00  |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O | 1664,64 | H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>                       | 4,80   | Saharoza                  | 30000,00 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 265,00  | MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O                 | 33,80  | Glicin                    | 2,00     |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                        | 1559,00 | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O | 0,39   | Myo-inositol              | 100,00   |
| MgSO <sub>4</sub>                                     | 361,49  | ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O                | 17,00  | Nikotinska kis.           | 1,00     |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                       | 1416,00 |                                                      |        | Tiamin HCl                | 2,00     |
|                                                       |         | DKW FeEDDHA                                          | 118,00 | PPM                       | 2ml      |
|                                                       |         | DKW FeNaEDTA                                         | 44,63  | BAP                       | 0,8ml    |
|                                                       |         |                                                      |        | IBA                       | 0,01ml   |
|                                                       |         |                                                      |        | pH                        | 6,0      |

### 3.3.3. EDDHA

FeEDDHA (etilendiamin di-2-hidroksifenil acetat ferric) je kelatni oblik željeza (Slika 19.) koji Zawadzka i Orlikowska, 2006a.; Van der Salm i sur., 1994. koriste u prevladavanje željezne kloroze kod ruža u kulturi tkiva. Dobrotvorni učinci FeEDDHA na ostalim kulturama *in vitro*, kao što su papaja (Castillo i sur., 1997), Vaccinium vrste (Shibli i sur., 1997), pripisuju se visokoj stabilnosti tog željeznog kelata, što omogućuje postojanost željeza i održavanje konstantne početne ionske ravnoteže u mediju (Shibli i sur., 2002).



**Slika 19.** EDDHA FERRIC (Foto: Jaredić, 2018.)

### 3.3.4. FeNaEDTA

FeNaEDTA (etilendiaminetetraoctena kiselina) vrlo se brzo razgrađuje (Slika 20.) u prisutnosti sunčeve svjetlosti (Bucheli-Witschel i Egli, 2001). U istraživanju mikropropagacije podloge za Citruse apostrofira se kako FeNaEDTA kelat ima toksičan učinak. FeNaEDTA je kako je već navedeno foto-labilan, a slobodni ioni željeza stvaraju aktivni kisik koji izazva destrukciju mnogih komponenti u mediju (Dunlap i Robacker, 1988; Becana i sur., 1998). Slobodni željezni ioni mogu se istaložiti kao Fe-fosfat, te ga učiniti nedostupnim u mediju, dok sama EDTA može inducirati proizvodnju formaldehida koji je toksičan za biljne eksplantate (Hangarter i Stasinopoulous, 1991).



**Slika 20.** FeNaEDTA (Izvor: <http://picssr.com/tags/disodium>)

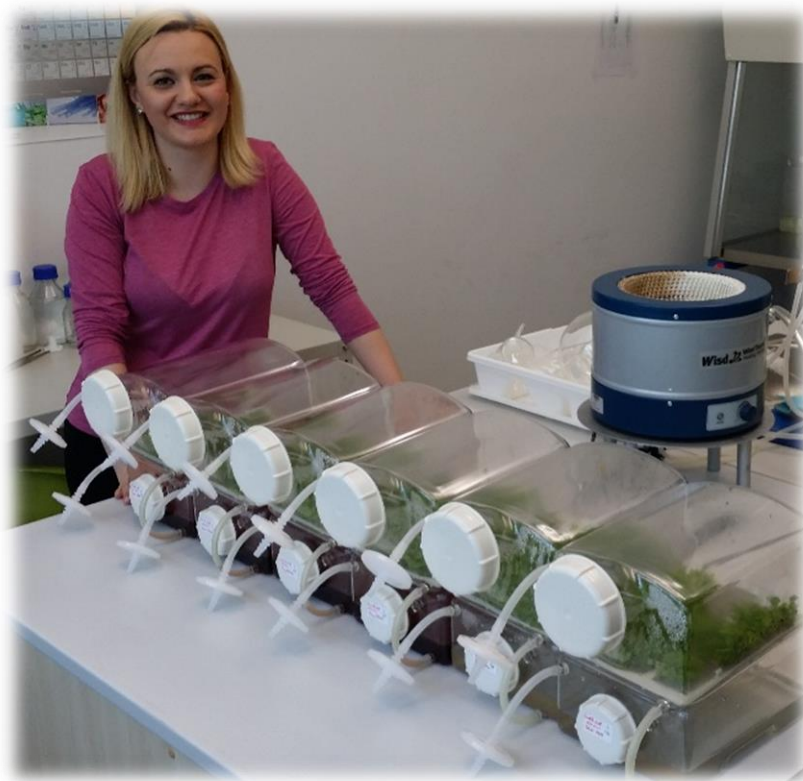
### 3.3.5. Sustav i konzistencija medija

U ovom istraživanju uspoređivan je suvremeni sustav imerznih bioreaktora (TIB/TIS sustav) koji koristi tekući medij s konvencionalnim *in vitro* modelom proizvodnje na polučvrstom mediju (agar) koji je predstavljao kontrolu. Svaki tretman u klasičnom sustavu uključivao je po 4 teglice, odnosno ponavljanja s po 15 biljaka unutar svake teglice (ukupno: 3 tretmana x 4 teglice = 12 teglica; 60 biljaka).



Svaki tretman na suvremenom TIB sustavu (Slika 21.) uključivao je 2 repeticije, odnosno 2 bioreaktora po svakom tretmanu s po 150 biljaka unutar svakog bioreaktora (ukupno: 3 tretmana x 2 bioreaktora = 6 bioreaktora; 900 biljaka).

Sustav je pomoću CPU upravljačke jedinice postavljen u režimu 4 imerzije (potapanja) u danu, odnosno svakih 6 sati u trajanju od 3 minute uz ventilaciju sustava svaka 3 sata u trajanju od 2 minute.



**Slika 21.** TIB sustav - tekući medij (Foto: Bošnjak, 2018.)

### 3.5. Mjerenja u istraživanju

U ovom istraživanju promatrali smo utjecaj tretmana na sljedeće parametre:

- morfološke parametre (slika 22.) na oba sustava (polučvrsti i tekući medij):
  - ❖ vizualna opažanja tijekom razvoja
  - ❖ visina biljaka
  - ❖ broj izdanaka/stabljika
  - ❖ broj listova
  - ❖ dužinu listova
  - ❖ širinu listova

- mjerenje koncentraciji pH na imerznom TIB sustavu (samo tekući medij):
  - ❖ nakon 7 dan
  - ❖ na kraju ciklusa (14 dana)
- multiplikacija biljaka iz oba sustava (polučvrsti i tekući medij)

Nakon 7 dana vizualnom metodom obavljena je kontrola svih uzoraka (promjene na biljnom materijalu), a u laminarnom kabinetu izmjerena je pH vrijednost svih tretmana u bioreaktorima na tekućem mediju (Slika 23.). Nakon 14 dana (2 tjedna), odnosno na kraju proizvodnog ciklusa pristupilo se mjerenju morfoloških parametara na svim tretmanima u bioreaktorima (tekući medij). Mjerenje morfoloških parametara na tretmanima s polučvrstim medijem (konvencionalni sustav) obavljeno je nakon 30 dana, odnosno kada su biljke dostigle vegetativnu masu. Po završetku utvrđena je stopa multiplikacije biljaka u oba sustava.



**Slika 22.** Morfološka mjerenja u istraživanju  
(Foto: Bošnjak, 2018.)



**Slika 23.** Vizualizacija i mjerenje pH tekućeg medija na TIB sustavu  
(Foto: Bošnjak, 2018.)

### 3.6. Obrada podataka

Rezultati dobivenih podataka provedenih u ovom istraživanju analizirani su statističkim metodama obrade podataka pomoću Microsoft Office Excel 2013, SAS Software 9.3., programske podrške (2002.-2010., SAS Institute Inc., Cary, USA). Od statističkih metoda korištena je analiza varijance (ANOVA), kao i statistički testovi značajnosti za primijenjene tretmane, odnosno F-test i Fisher's LSD (*engl.* Least Significant Difference) u vrijednosti razine od  $p \leq 0.05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Vizualna opažanja tijekom razvoja

U provedbi prve kontrole biljaka na polučvrstom mediju (konvencionalni *in vitro* model) nakon 7 dana uočene su promjene na listovima kod određenih tretmana. Na tretmanu DKW FeNaEDTA listovi su bili dosta nekrotizirani. Uz zelenu, prevladava i žuto-smeđa boja listova (Slika 24.). Maline se sporije razvijaju u odnosu na prethodna dva tretmana (DKW FeEDDHA i MS(m) FeEDDHA). U istraživanju iz 1991. godine Hangarter i Stasinopoulous apostrofiraju kako kelatni oblik EDTA može inducirati proizvodnju formaldehida koji je toksičan za biljne eksplantate, a učinak se odražava na negativni daljnji proces rasta i razvoja eksplantata. Kod tretmana DKW FeEDDHA listovi malina sporije se razvijaju te je zabilježen sporiji razvoj biljaka u odnosu na tretman MS(m) FeEDDHA. Najbolji vizualni rezultati uočeni su na MS(m) FeEDDHA tretmanu (Slika 25.). Biljke na navedenom tretmanu najbolje napreduju, listovi najmanje pokazuju nekrozu u odnosu na prethodna dva tretmana. Napominjemo kako su se biljke razvile i dostigle željenu masu spremnu za daljnju multiplikaciju nakon 30 dana, a sve negativne pojave rubnih nekroza su nestale. Rubne nekroze listova i izdanka uz epinastiju (jako izduživanje gornjeg dijela) eksplantata kruške reducirane su na mediju koji je sadržavao povećanu koncentraciju Ca (Wanda i sur., 2013). Slabiji sadržaj klorofila u starijem lišću obično je povezano s deficitom magnezija (Bennett 1993), loša boja lista i lisne nekroze na eksplantatima kruške korigirani su povećanjem koncentracije  $MgSO_4$  (Wanda i sur., 2013). Navedeni rezultati recentnih istraživača opravdani su i u našem istraživanju na MS(m) mediju (tretman MS(m) FeEDDHA) koji je sadržavao 3 x veću koncentraciju navedenih mezo komponenti makro hraniva.



**Slika 24.** Tretman DKW FeNaEDTA  
nakon 7 dana (Izvor: Jaredić, 2018.)



**Slika 25.** Tretman MS(m) FeEDDHA  
nakon 7 dana (Foto: Jaredić, 2018.)



U bioreaktorima (tekući medij) tretman MS(m) FeEDDHA razvio je vizualno veće, ljepše i duže listove bez rubnih nekroza u odnosu na ostale tretmane. Kod tretmana DKW FeNaEDTA biljke su se dobro razvile ali je primijećen razvoj mnoštva sitnijih listova u odnosu na ostale varijante. Također je primijećena i rubna nekroza u vidu žućenja i odumiranja ruba lista (Slika 26.). Na tretmanu DKW FeEDDHA listovi biljaka su uredne zelene boje s rubnim nekrozama na manjim listovima ali u manjem broju. Primijećen je podjednak broj manjih i većih listova.



**Slika 26.** Biljke u TIB sustavu - Tretman MS(m) FeEDDHA lijevo i tretman DKW FeNaEDTA desno s rubnim nekrozama lista (Foto: Bošnjak, 2018.)

#### 4.2. pH vrijednost medija u tekućem sustavu

Na svim tretmanima s tekućim medijem nakon 7 dana došlo je do rapidnog pada pH vrijednosti (pH 5,31 – 4,53) ispod optimalne (pH 5,8 – 6,3) te promjene boje i mirisa medija (Tablica 4.). Na tretmanu MS(m) FeEDDHA boja i miris bili su uredi, ali tretman DKW FeNaEDTA i DKW FeEDDHA imao je zamućenu boju i neugodan miris. Tretman MS(m) FeEDDHA na kraju ciklusa rezultirao je najvećom pH vrijednost (pH 4,51) ali je bila ispod optimalne razine te je bojom i mirisom do kraja istraživanja ostao nepromijenjen.

**Tablica 4.** Kretanje pH vrijednosti na tretmanima s tekućim medijem.

| Tretmani                     | Početna pH vrijednost | Nakon 7 dana | Nakon 15 dana |
|------------------------------|-----------------------|--------------|---------------|
| MS(m) FeEDDHA (1 repeticija) | 6,0                   | 5,31         | 4,51          |
| MS(m) FeEDDHA (2 repeticija) | 6,0                   | 5,08         | 4,41          |
| DKW FeNaEDTA (1 repeticija)  | 6,0                   | 4,86         | 4,40          |
| DKW FeNaEDTA (2 repeticija)  | 6,0                   | 4,82         | 4,46          |
| DKW FeEDDHA (1 repeticija)   | 6,0                   | 4,54         | 4,31          |
| DKW FeEDDHA (2 repeticija)   | 6,0                   | 4,53         | 3,78          |

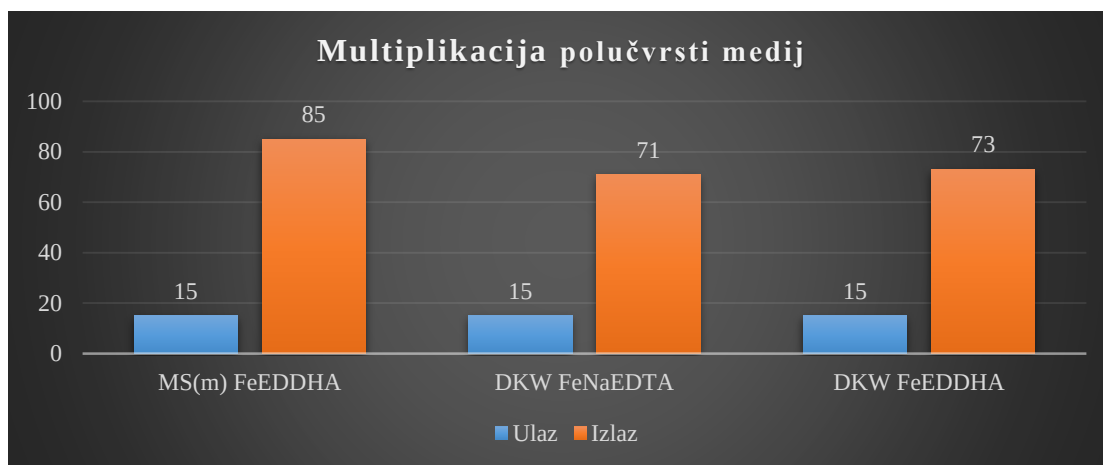
### 4.3. Multiplikacija biljaka

#### 4.3.1. Multiplikacija na polučvrstom mediju (konvencionalni in vitro model)

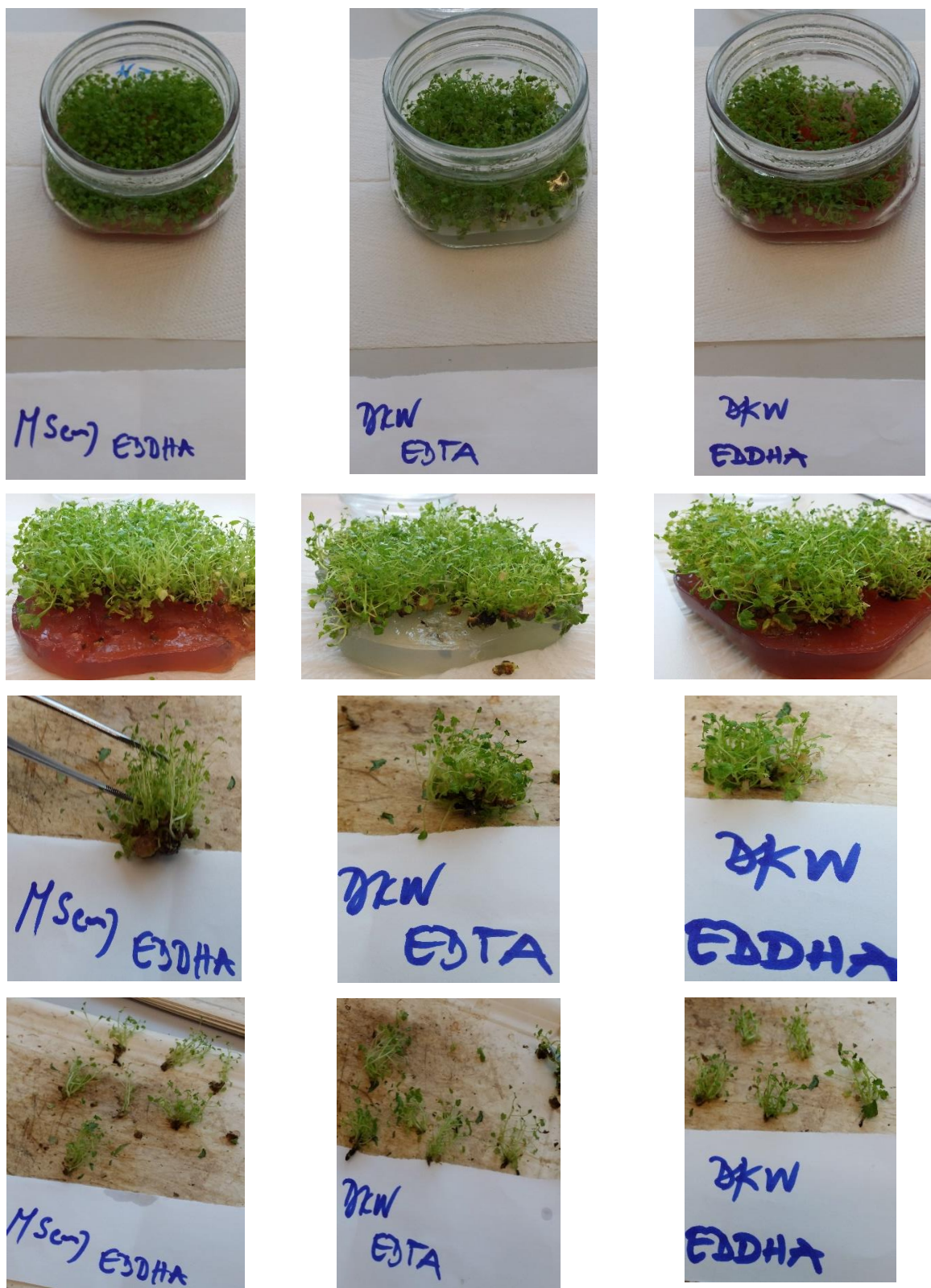
Stopa multiplikacije na klasičnom *in vitro* sustavu (polučvrsti medij) pri tretmanu MS(m) FeEDDHA bila je najveća (1 : 5,7) u odnosu na sve ostale klasične tretmane (Grafikon 5.). I ostali tretmani pokazali vrlo veliku stopu multiplikacije (Slika 27.) koja se kretala od 4,7 do 4,9 (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Multiplikacija biljaka na polučvrstom mediju.

| Tretmani             | Ulaz | Izlaz | Stopa multiplikacije |
|----------------------|------|-------|----------------------|
| <b>MS(m) FeEDDHA</b> | 15   | 85    | 1 : 5,7              |
| <b>DKW FeNaEDTA</b>  | 15   | 71    | 1 : 4,7              |
| <b>DKW FeEDDHA</b>   | 15   | 73    | 1 : 4,9              |



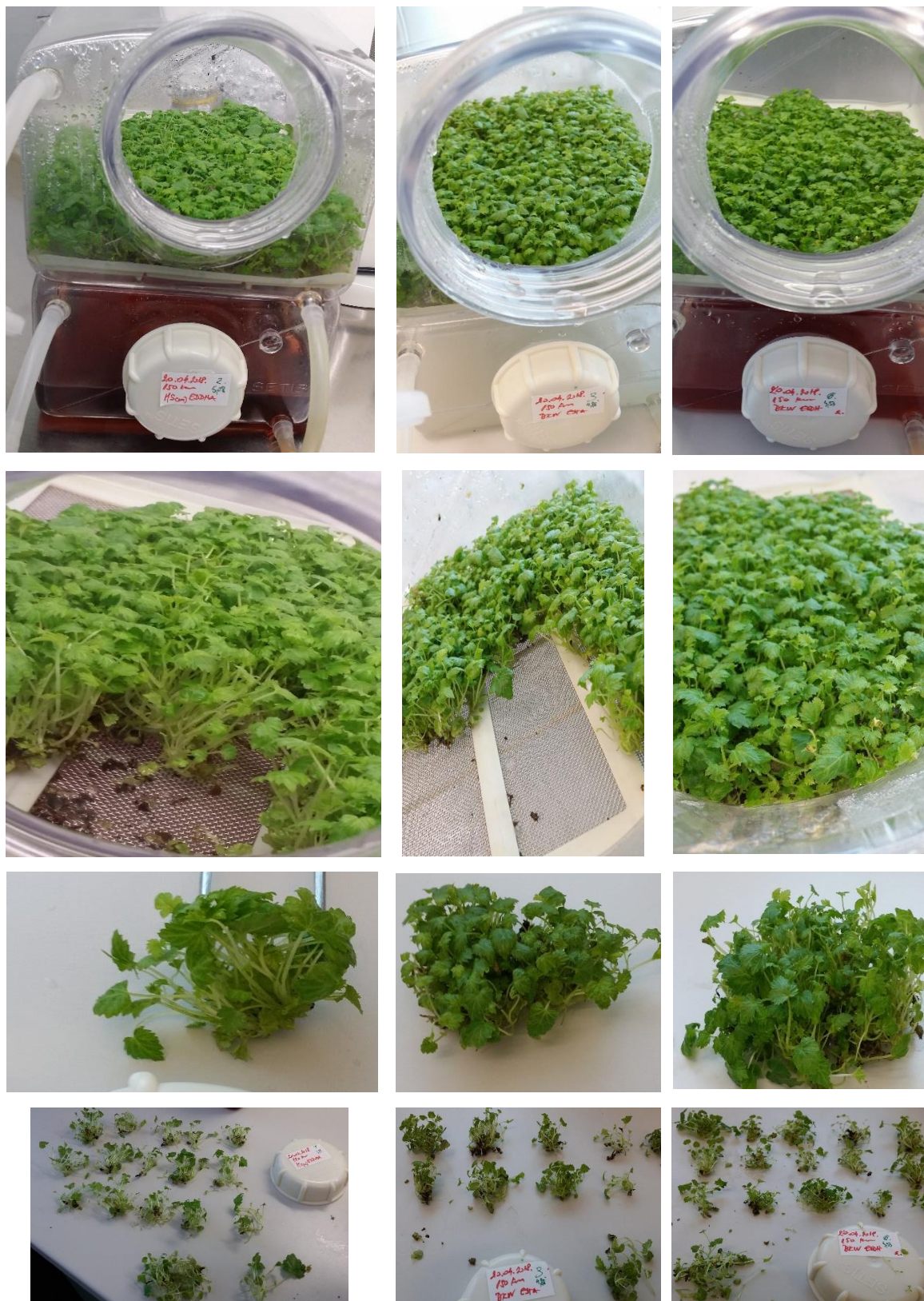
**Grafikon 5.** Grafički prikaz multiplikacije na polučvrstom mediju



Slika 27. Multiplikacija na tretmanima s polučvrstim medijem (Foto, Bošnjak, 2018.)



#### 4.3.2. Multiplikacija na tekućem mediju (TIB sustav)

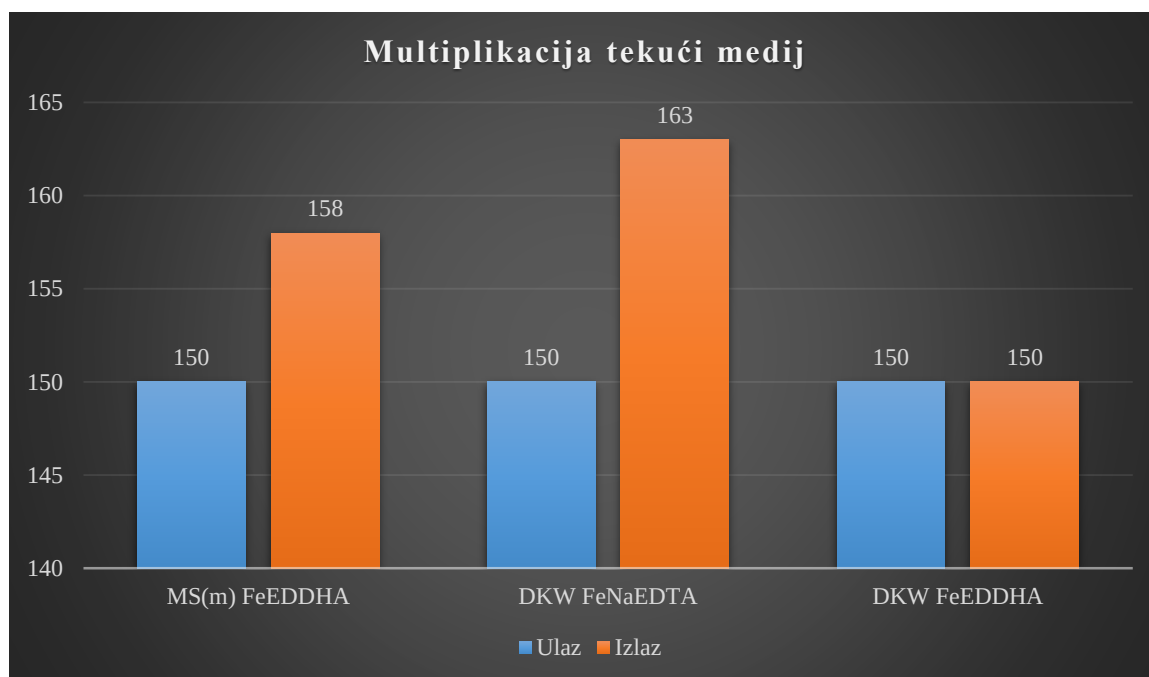


**Slika 28.** Multiplikacija na tretmanima s tekućim medijem (Foto, Bošnjak, 2018.)

Na tekućem mediju multiplikacije nije niti bilo (Tablica 6.), odnosno razvila se vrlo velika vegetativna masa biljaka (Slika 28.), a neznatno veći broj multipliciranih biljaka (163 eksplantata) u odnosu na ostale tretmane inicirao je tretman DKW FeNaEDTA (Grafikon 6.). Welander i sur. (2014) iznose podataka kako korištenjem imerznog sustava (TIB sustav RITA®) nisu dobili značajno povećanje multiplikacije u odnosu na polučvrsti medij (kontrola).

**Tablica 6.** Multiplikacija biljaka na tekućem mediju.

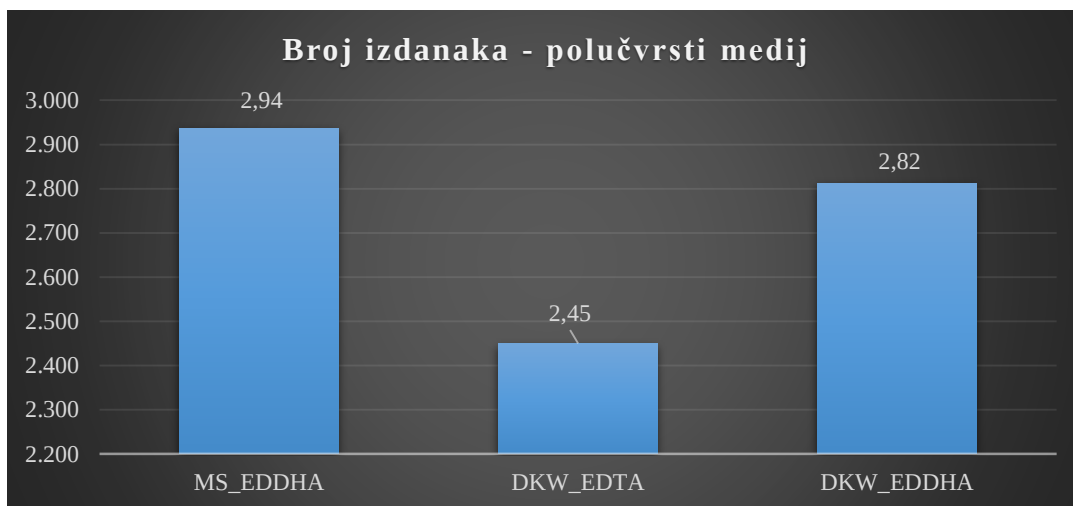
| Tretmani             | Ulaz | Izlaz | Stopa multiplikacije |
|----------------------|------|-------|----------------------|
| <b>MS(m) FeEDDHA</b> | 150  | 158   | 1,05                 |
| <b>DKW FeNaEDTA</b>  | 150  | 163   | 1,09                 |
| <b>DKW FeEDDHA</b>   | 150  | 150   | 1,0                  |



**Grafikon 6.** Grafički prikaz multiplikacije na tekućem mediju TIB sustav

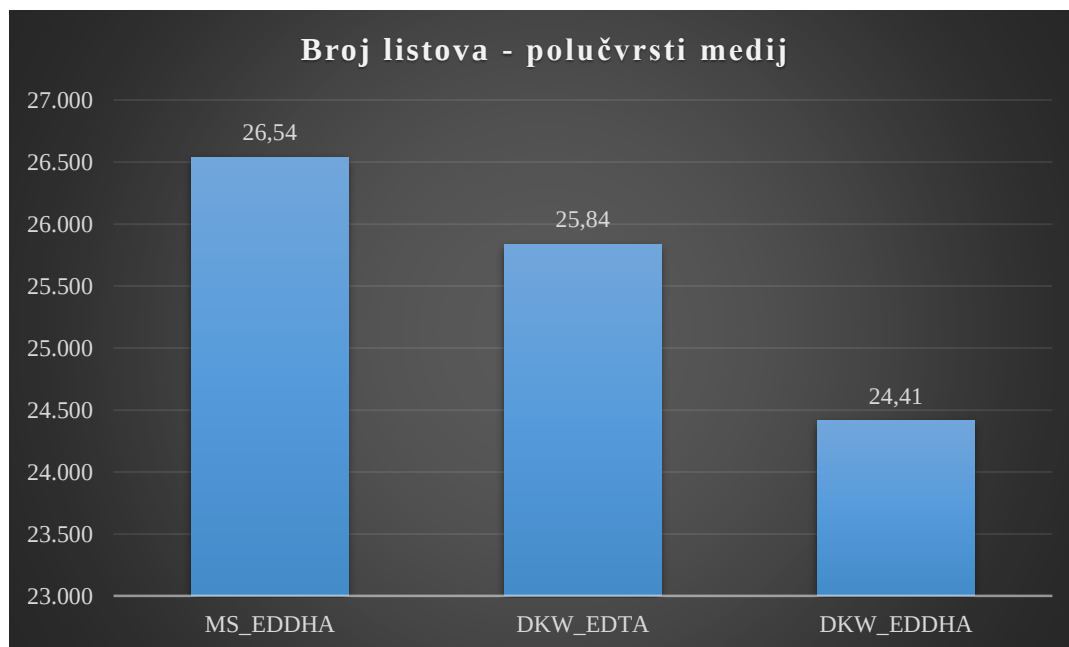
#### 4.4. Morfološki parametri na polučvrstom mediju

Najveći broj nastalih stabljika/izdanaka (Grafikon 7.) dobiven je pri tretmanu MS(m) FeEDDHA (2,94), a najmanje na tretmanu DKW FeNaEDTA (2,45).



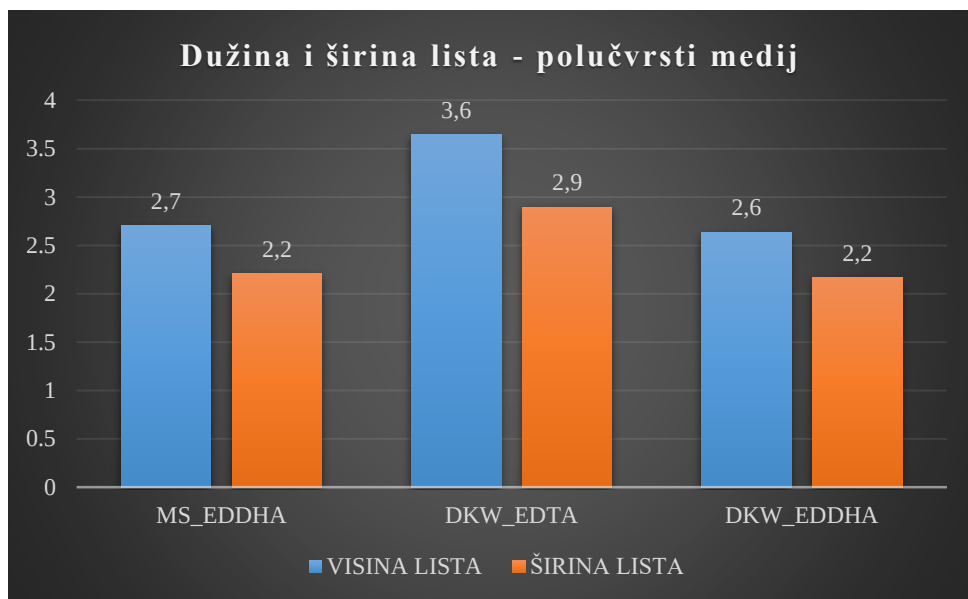
**Grafikon 7.** Grafički prikaz broja stabljika/izdanaka za tretmane na polučvrstom mediju

Također, tretman MS(m) FeEDDHA pokazao je svoju superiornost po pitanju razvoja vegetativne mase (26,54) u odnosu na ostale tretmane (Grafikon 8.). Najmanja vegetativna masa zabilježena je pri tretmanu DKW FeEDDHA (24,41)



**Grafikon 8.** Grafički prikaz broja listova za tretmane na polučvrstom mediju

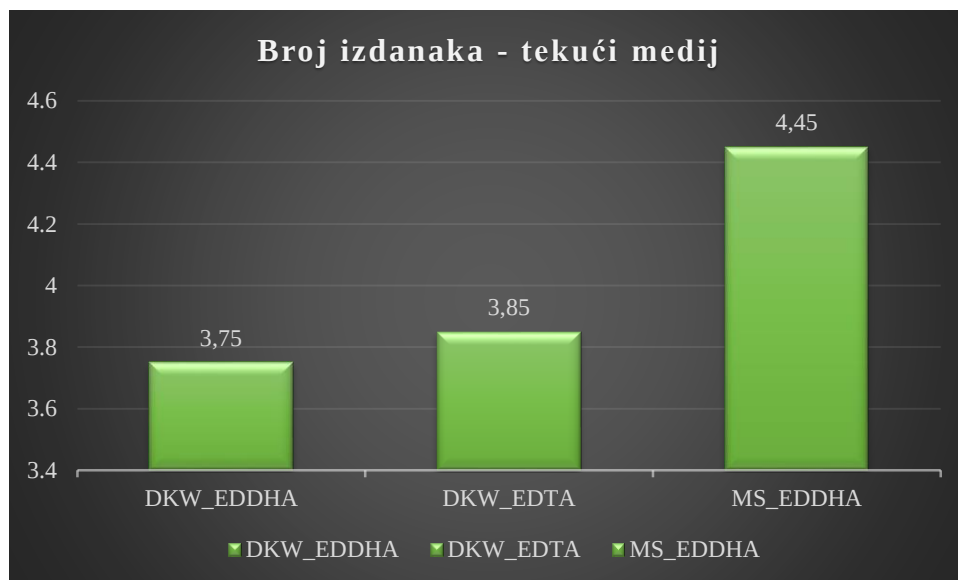
Tretman DKW FeNaEDTA rezultirao je najvećim i najširim listovima (3,6/2,9) u odnosu na ostale tretmane, dok između ostalih tretmana nije bilo razlike u veličini lista (Grafikon 9.).



**Grafikon 9.** Grafički prikaz dužine i širine lista za tretmane na polučvrstom mediju

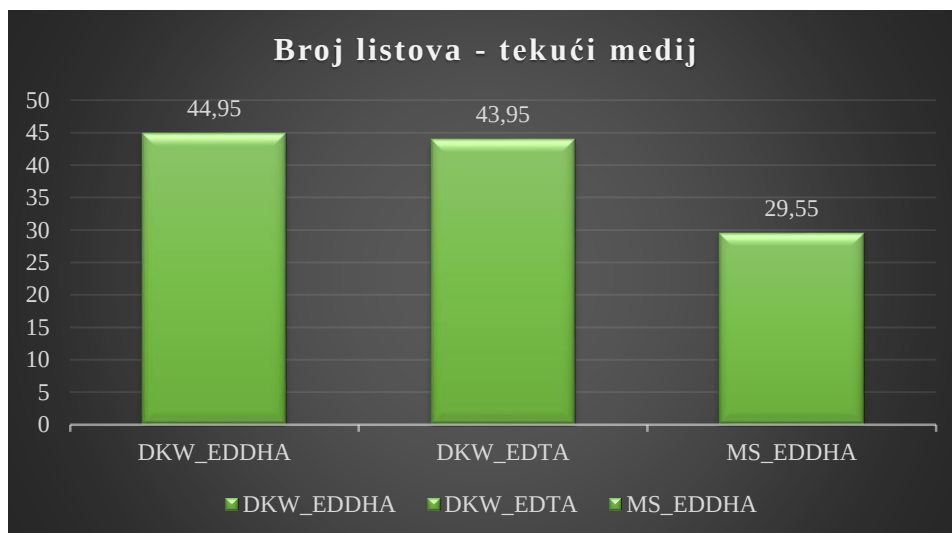
#### 4.5. Morfološki parametri na tekućem mediju

I na tekućem mediju tretman MS(m) FeEDDHA razvio je najveći broj izdanaka (4,45) u odnosu na ostale tretmane (Grafikon 10.). Najmanje izdanaka zabilježeno je na tretmanu DKW FeEDDHA (3,75).



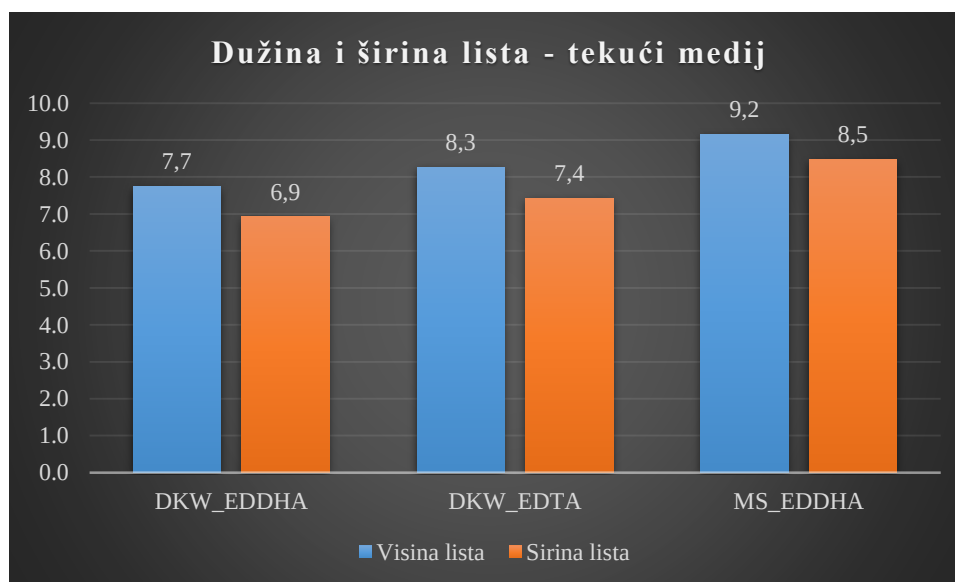
**Grafikon 10.** Grafički prikaz broja stabljika/izdanaka za tretmane na tekućem mediju





**Grafikon 11.** Grafički prikaz broja listova za tretmane na tekućem mediju

Najveći broj listova (Grafikon 11.) zabilježen je na tretmanu DKW FeEDDHA (44,95) ali i pri tretmanu s istim medijem ali drugim kelatnim oblikom željeza DKW FeNaEDTA (43,95). Najmanje listova razvio je tretman MS modificiranim medijem MS(m) FeEDDHA (29,55).



**Grafikon 12.** Grafički prikaz dužine i širine lista za tretmane na tekućem mediju

Tretman MS(m) FeEDDHA razvio je najveće listove (9,2/8,5) u odnosu na ostale tretmane (Grafikon 12.). Najmanji listovi zabilježeni su pri tretmanu DKW FeEDDHA (7,7/6,9).

## 5. RASPRAVA

Na razini cijelog pokusa (Tablica 7.) tretman s modificiranom MS(m) podlogom koji je sadržavao željezo u obliku kelata FeEDDHA rezultirao je značajno većom visinom biljaka ( $34.76^A$ ) i brojem listova ( $28.03^A$ ) u odnosu na ostale tretmane. Poonthong i Reed (2014) iznose kako se smanjenjem koncentracije željeza za pola u MS mediju povećava visinu izdanaka, stoga ukoliko je poželjno da biljke budu još izduženije moguće je uzeti ovu opciju u obzir. Što se tiče veličine listova, najsitnije je razvio tretman DKW FeEDDHA ( $5.09^B/4.55^B$ ) koji su bili značajno kraći u odnosu na tretman s istom podlogom DKW ali s kelatnim obliku FeNaEDTA ( $5.93^A$ ) i značajno uži od tretmana MS(m)FeEDDHA ( $5.35^A$ ). Nije zabilježena značajnost između tretmana za parametar broj stabljika. Rapidni rast biljaka na početku kultivacije (proliferacija i veliki energetska zahtjev biljke) troši veliku količinu fosfora, stoga ukoliko je fosfor limitiran i porast biljaka će biti limitiran (Williams 1993; Adelberg i sur., 2010). Wanda i sur., (2013). na eksplantatima kruške (*Pyrus spp.*) te Poonthong i Reed (2015) na malini iznose kako se povećanjem koncentracije mezo komponenti makro hraniva, preciznije povećanjem  $KH_2PO_4$  i/ili smanjenjem  $MgSO_4$  povećava i broj izdanaka/stabljika na eksplantatima. U našem istraživanju ova teza nije potvrđena pri konvencionalnom modelu (nema značajnosti), ali kontrastno na imerznom sustavu biljke su razvile značajno veći broj izdanaka ( $4.02^A$ ) te je potvrđena.

Sustav koji koristi tekući medij (Tablica 7.) rezultirao je značajno većim brojem listova ( $39.48^A$ ) i izdanaka ( $4.02^A$ ), visinom i širinom listova ( $8.33^A/7.61^A$ ) u odnosu na konvencionalni sustav koji koristi polučvrsti medij (kontrola). Nije utvrđena razlika između sustava za promatrani parametar visina biljaka, odnosno svi sustavi (konvencionalni i imerzni) su rezultirali podjednakom visinom biljaka. Georgieva i sur. (2016) također iznose pozitivne rezultate korištenja imerznog sustava u proizvodnji maline. Poonthong i Reed (2014) iznose pozitivne rezultate utjecaja povećanja mezo hraniva u povećanju lisne mase 5 kultivara maline što je u potpunosti opravdano i u našem istraživanju. Wanda i sur., (2013 i 2015) apostrofiraju kako boja lista eksplantata kruške je pod većim utjecajem  $MgSO_4$  nego komponenti duška. Iako postoji velika interakcija između magnezija i dušika, odnosno povećana koncentracija dušika rezultira i povećanjem magnezija (klorofil) u biljnim tkivima (Bryla i sur. 2011.)

Također interakcija između tretmana i sustava je značajna za parametre visina, broj listova, dužina i širina lista (Tablica 7.).

**Tablica 7.** Statističke razlike na razini pokusa unutar tretmana i sustava te interakcija tretman x sustav za parametre visina, broj listova, broj stabljika, dužina i širina lista.

| Tretman                              | Visina             | Br. listova        | Br. stabljika     | Dužina lista       | Širina lista       |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| MS(m) FeEDDHA                        | 34.76 <sup>A</sup> | 28.03 <sup>A</sup> | 3.69              | 5.70 <sup>AB</sup> | 5.35 <sup>A</sup>  |
| DKW FeNaEDTA                         | 27.98 <sup>B</sup> | 34.88 <sup>B</sup> | 3.18              | 5.93 <sup>A</sup>  | 5.15 <sup>AB</sup> |
| DKW FeEDDHA                          | 24.28 <sup>C</sup> | 34.63 <sup>B</sup> | 3.28              | 5.06 <sup>B</sup>  | 4.55 <sup>B</sup>  |
| <i>F-test</i>                        | 24.70              | 4.68               | 1.30              | 2.21               | 2.86               |
| <i>P</i>                             | <.0001             | 0.0112             | 0.2762            | 0.1139             | 0.0612             |
| <b>Sustav (konzistencija medija)</b> |                    |                    |                   |                    |                    |
| Konvencionalni (polučvrsti)          | 28.60              | 25.53 <sup>B</sup> | 2.74 <sup>B</sup> | 2.80 <sup>B</sup>  | 2.43 <sup>B</sup>  |
| Imerzni TIB (tekući medij)           | 29.41              | 39.48 <sup>A</sup> | 4.02 <sup>A</sup> | 8.33 <sup>A</sup>  | 7.61 <sup>A</sup>  |
| <i>F-test</i>                        | 0.43               | 45.24              | 21.22             | 251.11             | 337.00             |
| <i>P</i>                             | 0.5144             | <.0001             | <.0001            | <.0001             | <.0001             |
| <b>Interakcija tretman x sustav</b>  |                    |                    |                   |                    |                    |
| <i>F-test</i>                        | 8.55               | 7.03               | 0.37              | 4.00               | 3.66               |
| <i>P</i>                             | 0.0003             | 0.0013             | 0.6891            | 0.0209             | 0.0289             |

\*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: <sup>AB</sup> razina  $p \leq 0.05$

### 5.1. Razlike između tretmana na polučvrstom mediju (konvencionalni *in vitro* model)

Unutar konvencionalnog modela *in vitro* proizvodnje tretmani MS(m) FeEDDHA (30.80<sup>A</sup>) i DKW FeNaEDTA (29.90<sup>A</sup>) razvili su značajno veće biljke u odnosu na tretman DKW FeEDDHA (25.10<sup>B</sup>). Nije zabilježena značajna razlika za parametre broj listova i broj stabljika, odnosno svi tretmanu su razvili podjednak broj listova i stabljika. Tretman DKW FeNaEDTA (3.60<sup>A</sup>/2.87<sup>A</sup>) inicirao je značajno veće listove u odnosu na ostala dva tretmana (Tablica 8.).

**Tablica 8.** Razlike između tretmana (MS(m) FeEDDHA, DKW FeNaEDTA i DKW FeEDDHA) unutar konvencionalnog *in vitro* modela (polučvrsti medij).

| Konvencionalni (polučv. medij) | Visina             | Br. listova | Br. stabljika | Dužina lista      | Širina lista      |
|--------------------------------|--------------------|-------------|---------------|-------------------|-------------------|
| MS(m) FeEDDHA                  | 30.80 <sup>A</sup> | 26.50       | 2.93          | 2.24 <sup>B</sup> | 2.22 <sup>B</sup> |
| DKW FeNaEDTA                   | 29.90 <sup>A</sup> | 25.80       | 2.50          | 3.60 <sup>A</sup> | 2.87 <sup>A</sup> |
| DKW FeEDDHA                    | 25.10 <sup>B</sup> | 24.30       | 2.80          | 2.55 <sup>B</sup> | 2.19 <sup>B</sup> |
| <i>F-test</i>                  | 4.10               | 0.54        | 1.32          | 5.40              | 4.32              |
| <i>p</i>                       | 0.0218             | 0.5859      | 0.2757        | 0.0071            | 0.0179            |

\*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: <sup>AB</sup> razina  $p \leq 0.05$

## 5.2. Razlike između tretmana na tekućem mediju (Imerzni TIB sustav)

Na imerznom sustavu, odnosno tekućem mediju tretman MS(m) FeEDDHA rezultirao je značajno većim biljkama ( $38.73^A$ ) koje su razvile i značajno veće listove ( $9.16^A/8.48^A$ ) u odnosu na tretman DKW FeEDDHA (Tablica 9.). Jedino je broj listova ( $29.55^B$ ) na tretmanu MS(m) FeEDDHA bio značajno manji u odnosu na ostala dva tretmana. Kao što je vidljivo tretman MS(m) FeEDDHA inicirao je vrlo krupne listove uslijed čega je i njihov broj bio manji (ograničenost unutar posude). Nije zabilježena značajna razlika u broju izdanaka između tretmana (Tablica 9.).

**Tablica 9.** Razlike između tretmana (MS(m) FeEDDHA, DKW FeNaEDTA i DKW FeEDDHA) unutar imerznog TIB sustava (tekući medij).

| <i>Imerzni TIB (tekući medij)</i> | <b>Visina</b> | <b>Br. listova</b> | <b>Br. stabljika</b> | <b>Dužina lista</b> | <b>Širina lista</b> |
|-----------------------------------|---------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| <b>MS(m) FeEDDHA</b>              | $38.73^A$     | $29.55^B$          | 4.45                 | $9.16^A$            | $8.48^A$            |
| <b>DKW FeNaEDTA</b>               | $26.05^B$     | $43.95^A$          | 3.85                 | $8.27^{AB}$         | $7.43^{AB}$         |
| <b>DKW FeEDDHA</b>                | $23.45^B$     | $44.95^A$          | 3.75                 | $7.58^B$            | $6.92^B$            |
| <i>F-test</i>                     | 29.17         | 7.03               | 0.75                 | 2.32                | 3.08                |
| <i>p</i>                          | <.0001        | 0.0019             | 0.4792               | 0.1080              | 0.0536              |

\*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: <sup>AB</sup> razina  $p \leq 0.05$

## 5.3. Razlike između sustava (polučvrsti i tekući medij) unutar tretmana DKW FeEDDHA, DKW FeNaEDTA i MS(m) FeEDDHA.

Suvremeni imerzni TIB sustav (Tablica 10.) na svim ispitivanim tretmanima ( $7.58^A/6.92^A$  DKW FeEDDHA,  $8.27^A/7.43^A$  DKW FeNaEDTA i  $9.16^A/8.48^A$  MS(m) FeEDDHA) inicirao je značajno veće listove i broj izdanaka. Nije utvrđena značajna razlika kod oba DKW tretmana za parametar visina, odnosno oba sustava (polučvrsti i tekući) su inicirali podjednaku visinu biljaka dok je na tretmanu s MS(m) FeEDDHA zabilježena značajno veća visina biljaka ( $38.73^A$ ) na tekućem mediju (imerzni TIB sustav). Kod tretmana MS(m) FeEDDHA nije bilo značajne razlike u broju listova između oba sustava (polučvrsti i tekući). Imerzni TIB sustav inicirao je značajno veći broj listova u odnosu na konvencionalni model pri oba tretmana s DKW medijem (DKW FeNaEDTA –  $43.95^A$  i DKW FeEDDHA –  $44.95^A$ ). Svi tretmani na imerznom TIB sustavu inicirali su značajno veći broj stabljika/izdanaka u odnosu na konvencionalni model (DKW FeEDDHA –  $3.75^A$ , DKW FeNaEDTA –  $3.85^A$  i MS(m) FeEDDHA –  $4.45^A$ ).

**Tablica 10.** Razlike između sustava (polučvrsti i tekući medij) unutar tretmana DKW FeEDDHA, DKW FeNaEDTA i MS(m) FeEDDHA.

| <b>DKW FeEDDHA</b>    | <b>Visina</b>      | <b>Br. listova</b> | <b>Br. stabljika</b> | <b>Dužina lista</b> | <b>Širina lista</b> |
|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Konvencionalni</i> | 25.10              | 24.30 <sup>B</sup> | 2.80 <sup>B</sup>    | 2.55 <sup>B</sup>   | 2.19 <sup>B</sup>   |
| <i>Imerzni TIB</i>    | 23.45              | 44.95 <sup>A</sup> | 3.75 <sup>A</sup>    | 7.58 <sup>A</sup>   | 6.92 <sup>A</sup>   |
| <i>F-test</i>         | 1.17               | 33.06              | 7.30                 | 80.95               | 117.13              |
| <i>p</i>              | 0.2864             | <.0001             | 0.0102               | <.0001              | <.0001              |
| <b>DKW FeNaEDTA</b>   | <b>Visina</b>      | <b>Br. listova</b> | <b>Br. stabljika</b> | <b>Dužina lista</b> | <b>Širina lista</b> |
| <i>Konvencionalni</i> | 29.90              | 25.80 <sup>B</sup> | 2.50 <sup>B</sup>    | 3.60 <sup>B</sup>   | 2.87 <sup>B</sup>   |
| <i>Imerzni TIB</i>    | 26.05              | 43.95 <sup>A</sup> | 3.85 <sup>A</sup>    | 8.27 <sup>A</sup>   | 7.43 <sup>A</sup>   |
| <i>F-test</i>         | 1.85               | 26.33              | 16.67                | 58.44               | 103.48              |
| <i>p</i>              | 0.1817             | <.0001             | 0.0002               | <.0001              | <.0001              |
| <b>MS(m) FeEDDHA</b>  | <b>Visina</b>      | <b>Br. listova</b> | <b>Br. stabljika</b> | <b>Dužina lista</b> | <b>Širina lista</b> |
| <i>Konvencionalni</i> | 30.80 <sup>B</sup> | 26.50              | 2.93 <sup>B</sup>    | 2.24 <sup>B</sup>   | 2.22 <sup>B</sup>   |
| <i>Imerzni TIB</i>    | 38.73 <sup>A</sup> | 29.55              | 4.45 <sup>A</sup>    | 9.16 <sup>A</sup>   | 8.48 <sup>A</sup>   |
| <i>F-test</i>         | 18.42              | 0.70               | 5.08                 | 115.58              | 120.37              |
|                       | 0.0001             | 0.4083             | 0.0300               | <.0001              | <.0001              |

\*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: <sup>AB</sup> razina  $p \leq 0.05$

## 6. ZAKLJUČAK

Svjedoci smo kako se sve češće na globalnoj razini informira javnost o zdravoj prehrani, odnosno funkcionalnoj hrani, supervoću koje je bogato antioksidansima. Svo bobičasto voće, a među njima i malina (*Rubus idaeus L.*) uživa ogromnu popularnost među potrošačima upravo iz ovih razloga. Posljednjih godina i u kulturi tkiva došlo je do velikog napretka pri mikropropagaciji maline. Automatizacija procesa pomoću suvremenih imerznih bioreaktora (TIB sustavi) koji koriste tekući medij uvelike je ubrzala i smanjila troškove mikropropagacije maline.

Ovim diplomskim radom provedenim na Fakultetu za agrobiotehničke znanosti u Osijeku na Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo pri voćarskom laboratoriju za kulturu tkiva zaključili smo sljedeće:

Cjelokupan pokus mikropropagacije uspješno je proveden bez prisustva kontaminacije na biljkama ili mediju. Na polučvrstom mediju (konvencionalni sustav) biljke su postigle zadovoljavajuću masu sposobnu za multiplikaciju nakon 30 dana. Frekvencija imerzije sustava koji koristi tekući medij (TIB sustav) 4 puta u danu (svakih 6 sati po 3 minute) s ventilacijom sustava svaka 3 sata (trajanje 2 minute) rezultirala je idealnim razvojem biljnog materijala za svega 15 dana.

Tretman s modificiranim MS medijem (MSm) i kelatnim oblikom željeza EDDHA rezultirao je značajno većim listovima i biljkama te brojem listova, odnosno ukupna vegetativna masa na oba sustava (TIB i konvencionalni) pri tretmanu MS(m) FeEDDHA bila je bolja u odnosu na ostale tretmane s DKW medijem. Svi promatrani parametri na biljkama (visina biljaka, broj listova, broj stabljika, dužina i širina lista) bili su značajno veći na tekućem mediju. Imerzni sustav opravdao je recentne navode o svojoj učinkovitosti u skraćanju proizvodnog ciklusa (15 dana) i značajno boljim morfološkim parametrima (broj i veličina listova, broj izdanaka) u odnosu na konvencionalni *in vitro* model.

Povećanje mezo komponenti makro hraniva u MS mediju ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  i  $\text{CaCl}_2$ ) uz korištenje vrlo stabilnog kelatnog oblika željeza EDDHA rezultiralo je najvećom stopom multiplikacije biljaka na konvencionalnom *in vitro* sustavu (5.7).

Jedini uočeni nedostatak kod sustava s tekućim medijem je stabilizacija pH, odnosno svakim danom uslijed imerzije, miješanja medija ali i otpuštanja štetnih fenolnih komponenti pa i



etilen iz eksplantata došlo je do rapidnog pada pH vrijednosti koji je već za 7 dana postao neoptimalan tj. kretao se oko pH 5,0, a za 15 dana pao na čak pH 3,0. Ovakav pH nije idealan za biljke te je primijećeno zamućenje i razvoj određenih prisutnih latentnih patogena koji se razvijaju jedino pri takvim uvjetima (drugo istraživanje). Pretpostavljamo da je izostanak multiplikacije na tekućem mediju povezan upravo s rapidnim padom pH vrijednosti tekućeg medija te zbog toga opada i pristup, odnosno razina potrebne koncentracije hormona potrebnih u indukciji novih izdanaka. Također pretpostavka je i da korišteni citokinin (BAP) i odnos citokinina/auksina u ovom istraživanju je potpuno nepogodan za ovakav tip sustava.

Buduća istraživanja na ovom sustavu potrebno je usmjeriti u pravcu rješavanja navedenih nedostataka, prvenstveno stabilizacija pH vrijednosti i određivanje optimalnog odnosa i koncentracije citokinina/auksina te mogućnost upotreba tidiazurona, zeatina, itd.

Optimizacija medija, odnosno pojedinih komponenti mineralne ishrane nameće se kao neophodno u standardizaciji i poboljšanju protokola mikropropagacije maline. Velika genetska varijabilnost između pojedinih kultivara ili grupa iz roda *Rubus sp.* rezultira različitim odgovorom na sadržaj hraniva u mediju. Kultivacija biljaka putem bioraktora izuzetno je prikladna ukoliko nam je u cilju vrlo brza produkcija, odnosno akumulacija svježe biomase. Primjena bioreaktora u različite svrhe proizvodnje zahtijevaju daljnju optimizaciju hranjivog medija i preciziranje uvjeta uzgoja pojedinih voćnih vrsta i sorti unutar vrste. Uporaba MS medija s modifikacijom mezo komponenti makro hraniva ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  i  $\text{CaCl}_2$ ) uz upotrebu željeznog kelata EDDHA sa sigurnošću možemo reći da je vrlo učinkovita u mikropropagacije maline.

## 7. POPIS LITERATURE

- Adelberg JW, DelgadoM, Tomkins JT (2010) Spent medium analysis for liquid culture micropropagation of *Hemerocallis* on Murashige and Skoog medium. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 46:95–107
- Alberheim P. and Darvill AG, 1984: *Ann Rew Plant Physiol.* 35, 243-275
- Anderson WC (1980) Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. *Acta Horti* 112:13–20
- Arencibia D. A., Garcia-Gonzales R., Vergara C., Carrasco B. Čile, 2013. Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) in *Scientia Horticulturae* 160:49–53
- Bairu MW, Stirk WA, Van Staden J (2009) Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 98:239–248
- Becana, M., Moran, J. F. and Iturbe-Ormaetxe, I. (1998). Irondependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil*, 201, 137–147.
- Bennett WF (1993) Nutrient deficiencies and toxicities in crop plants. APS Press, Minneapolis
- Bryla DR, Rempel HG, Hart JM, Strik BC (2011) Accumulation, partitioning, and loss of mineral nutrients in ‘Meeker’ red raspberry at various stages of phenological development. Unpublished data
- Broome, O. C. and Zimmerman, R. H. 1978. In vitro propagation of blackberry. *HortScience* 13: 151-153.
- Bucheli-Witschel, M.; Egli, T. (2001), "DAB: Environmental Fate and Microbial Degradation of Aminopolycarboxylic Acids", *FEMS Microbiology Reviews*, 25 (1): 69–106.
- Can. J. Plant Sci. Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation 91: 147-157).

- Castillo, B., Smith, M. A. L., Madhavi, D. L. and Yadava, U. L. (1997). Interaction of irradiance level and iron source during shoot tip culture of *Carica papaya* L. *HortScience*, 32, 1120–1123.
- Cousineau J.C., Donnelly D.J. 1991. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue cultured and greenhouse-grown raspberry. *PLANT CELL, TISS. ORG. CULT.* 27: 249-255.
- Dale PJ and Webb KJ, 1985: pp 79-96. U: SWJ Bright and MGK Jones (Eds.): *Cereals Tissue and Cell Culture*. Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht, The Netherlands
- Dantas AK, Majada JP, Fernández B, Cañal MJ (2001) Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. *Plant Growth Regul* 33:237–243
- Debergh P. and Maene L, 1981: *Sci Hortic.* 14, 335-345
- Debnath, S. C. 2004. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through in vitro axillary shoot proliferation. *Plant Growth Regul.* 43: 179-186.
- Debnath, S. C. 2007. A two-step procedure for in vitro multiplication of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) shoots using bioreactor. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 88: 185-191.
- Debnath, S. C. 2010. A scaled-up system for in vitro multiplication of thidiazuron-induced red raspberry shoots using a bioreactor. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 85: 94-100.
- Dunlap, J. R. and Robacker, K. M. (1988). Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic acid in tissue culture. *Plant Physiology*, 88, 379–382
- Epstein E, Bloom A (2005) *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*. Sinauer Associates, Sunderland, 380 pp
- Georgieva, L., Tsvetkov, I., Georgieva, M., Kondakova, V. (2016). New Protocol for in vitro Propagation of Berry Plants by TIS Bioreactor. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22 (No 5) 2016, 745–751 Agricultural Academy
- Gonzalez, M. V., Lopez, M., Valdes, A. E. and Ordas, R. J. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Ann. Appl. Biol.* 137: 73-78.

- Greenway MB, Phillips IC, Lloyd MN, Hubstenberger JF, Phillips GC (2012) A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 48:403–410
- Hammerschlag FA, 1982: *J Am Soc Hort Sci.* 107, 44-47
- Hangarter, R. P. and Stasinopoulous, T. C. (1991). Effect of Fecatalysed photo-oxidation of EDTA on root growth in plant culture media. *Plant Physiology*, 96, 843–847
- Harper, P. C. 1978. Tissue culture propagation of blackberry and tayberry. *Hortic. Res.* 18: 41-143.
- Harris R, Masson E (1983) Two machines for in vitro propagation of plants in liquid media. *Can J Plant Sci* 63:311–316
- Heyerdahl, Mohan Jain S., Gupta K. P., J. Newton R. 1995, 1999: Somatic Embryogenesis in Woody Plants, 263-291
- Hu CY and Wang PJ , 1983: pp 177-227. U: DA Evans et. al.(Eds.): *Handbook of Plant Cell Culture. Vol.1. Techniques for Propagation and Breeding.* Macmillan Publ CO., New York
- Ivanova M, Van Staden J (2009) Nitrogen source, concentration, and  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured Aloe polyphylla. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 99: 167–174
- Jafari Najaf-Abadi, A. and Hamidoghli, Y. 2009. Micropropagation of thornless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axillary bud explants. *Austr. J. Crop Sci.* 3: 191-194.
- Jelaska, S.: „Kultura biljnih stanica i tkiva – temeljna istraživanja i primjena“, Školska knjiga, Zagreb, 1994.
- Levin R & Vasil I K (1989) Progress in reducing the cost of micro- propagation. *IAPTC Newsletter* 59:2-12
- Maene L. and Debergh P., 1985: *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 5, 23-33
- Molassiotis, A. N., Dimassi, K., Therious, I. and Diamantidis, G. (2003). Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* P. *persica*) explants in vitro. *Biologia Plantarum*, 47, 141–144

- Molassiotis, A. N., Dimassi, K., Diamantidis, G. and Therious, I. (2004). Changes in peroxidase and catalase activity during in vitro rooting. *Biologia Plantarum*, 48, 1–5
- Murashige, T; Skoog, F (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473–497
- Murashige T, Serpa M and Jones JB, 1974: *HortScience* 9, 175-180 Neal, J.C., M.P. Pritts, and A.F. Niedz RP, Hyndman SE, Evens TJ (2007) Using a gestalt to measure the quality of in vitro responses. *Scientia Horti* 112:349–359
- Nikolić M., Milivojević M. J: „Jagodaste voćke – tehnologija gajenja, Beograd 2010, Naučno Voćarstvo Društvo Srbije, Čačak, 1966.
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D. and Hahn, E. J. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81: 287-300.
- Poothong S, Reed BM (2014) Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries. *Scientia Horti* 165:132–141
- Poothong, S. i Reed B. M. (2015). Increased  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  improve the growth of micropropagated red raspberries. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* (2015) 51:648–658 DOI: 10.1007/s11627-015-9720-y
- Ramage CM, Williams RR (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38:116–124
- Reed BM (1990) Multiplication of *Rubus* germplasm in vitro: a screen of 256 accessions. *Fruit Var J* 44:141–148
- Reed BM, Wada S, DeNoma J, Niedz RP (2013a) Improving in vitro mineral nutrition for diverse pear germplasm. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:343–355
- Reed BM, Wada S, DeNoma J, Niedz RP (2013b) Mineral nutrition influences physiological responses of pear in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:699–709
- Ružić D, Sarić M, Cerović R, Čulafić L (2000) Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 63: 9–14

- Shibli, R.A., Smith, M.A. L. and Nasr, R. (1997). Iron source and cytokinin mitigate the incidence of chlorosis and hyperhydration in vitro. *Journal of Plant Nutrition*, 20, 773–781.
- Shibli, R.A., Mohammad, M. J. and Ajlouni, Z. I. (2002). Growth and micronutrient acquisition of in vitro-grown bitter almond and sour orange in response to iron concentration from different iron chelates. *Journal of Plant Nutrition*, 25, 1599–1606.
- Stanisavljević, A., Štolfa Čamagajevac, I., Popović, B., Bošnjak, D., Kujundžić, T., Viljanac, B., Teklić, T. (2018). Aklimatizacija biljaka malina iz TIB sustava inokuliranih s *Bradyrhizobium* sp. i rizobakterijama promotorima biljnog rasta (PGPR). 53. hrvatski i 13. međunarodni simpozij agronoma - Zbornik radova, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 2018. str. 530-534
- Stanisavljević, A., Bošnjak, D., Štolfa, I., Špoljarević, M., Popović, B., Lisjak, M., Teklić, T. (2017). Suvremena klonska reprodukcija biljaka, Zbornik sažetaka 52. hrvatski i 12. međunarodni simpozij agronoma, Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2017. 265-266
- Tsao C, Reed BM (2002) Gelling agents, silver nitrate, and sequestrene iron influence adventitious shoot and callus formation from *Rubus* leaves. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38:29–32
- Van Der Salm, T. P. M., Van Der Toorn, C. J. G., Ten Cate, C. H. H., Dubois, L.A.M., De Vries, D. P. and Dons, H. J. M. (1994). Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. 'Moneway'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37, 73–77.
- Van Telgen et al., 1992; De Klerk, 2000: Rooting of microcuttings: Theory and practice, in *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 38(5):415-422 · September 2002
- Wada S, Maki S, Niedz RP, Reed BM (2015) In vitro response and ionic mineral analysis of genetically diverse pear species to increased mesos components (CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) in the growth medium. *Acta Physiol Plant* 37:1–10
- Wada S, Niedz RP, DeNoma J, Reed BM (2013) Mesos components (CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) are critical for improving pear micropropagation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:356–365



- Welander, M., J. Persson, H. Asp and L. H. Zhu, 2014. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 179 (24): 227–232.
- Williams RR (1993) Mineral nutrition in vitro—a mechanistic approach. *Aust J Bot* 41:237–251
- Wu, J.-H., Miller, S. A., Hall, H. K., Pauline, A. and Mooney, P. A. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 99: 1725.
- Zawadzka, M. and Orlikowska, T. (2006a). The influence of FeEDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85, 145–149
- Zawadzka M, Orlikowska T (2006b) Factors modifying regeneration in vitro of adventitious shoots in five red raspberry cultivars. *J Fruit Ornament Plant Res* 14:105–115

### **Internetski izvori:**

- <https://hr.wikipedia.org/wiki/Malina>, 13. lipnja, 2018.
- <http://www.ishrana.org/malina.html>, 13. lipnja 2018.
- <http://www.factfish.com/statistic/raspberries%2C%20production%20quantity>, 15. lipnja, 2018.
- <http://www.factfish.com/statistic-country/croatia/raspberries%2C%20production%20quantity>, 15. lipnja, 2018.
- <http://www.factfish.com/statistic-country/world/raspberries%2C%20production%20quantity>, 16. lipnja, 2018.
- [http://www.kfbih.com/uimages/Kongres\\_Buducnost\\_maline-FARMA\\_II.PDF](http://www.kfbih.com/uimages/Kongres_Buducnost_maline-FARMA_II.PDF), 25. lipnja, 2018.
- [https://en.wikipedia.org/wiki/Gottlieb\\_Haberlandt](https://en.wikipedia.org/wiki/Gottlieb_Haberlandt), 30. lipnja 2018.
- <http://aquaventure.co.th/tissueculture.html>, 3. srpnja 2018.

<http://www.uaiasi.ro/POSCCE/Rubusselect/files/MICROPROPAGATION%20OF%20RASPBERRY%20CULTIVARS%20BY%20TERMINAL%20AND%20LATERAL%20%20BUD%20EXPLANTS.pdf>, 4. srpnja, 2018.

[https://bib.irb.hr/datoteka/938727.sa2018\\_proceedings\\_-\\_rad.pdf](https://bib.irb.hr/datoteka/938727.sa2018_proceedings_-_rad.pdf), 5. srpnja, 2018.

<https://www.bib.irb.hr/pregled/znanstvenici/353785>, 10. srpnja, 2018.

<http://www.setis-systems.be/>, 12. srpnja, 2018.

<https://www.duchefa-biochemie.com/>, 15. srpnja, 2018.

<http://soils.wisc.edu/facstaff/barak/images/chelate.htm>, 15. srpnja, 2018.

<https://en.wikipedia.org/wiki/EDDHA>, 15. srpnja, 2018.

[https://en.wikipedia.org/wiki/Ethylenediaminetetraacetic\\_acid#Biodegradation](https://en.wikipedia.org/wiki/Ethylenediaminetetraacetic_acid#Biodegradation), 15. srpnja 2018.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377216>, 16. srpnja, 2018.

<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.4141/CJPS10131#.W2hGvtIzaHs>, 16. srpnja, 2018.

<http://journal.ashspublications.org/content/117/6/874.full.pdf>, 16. srpnja, 2018.

[https://www.researchgate.net/publication/225818833\\_Rooting\\_of\\_microcuttings\\_Theory\\_and\\_practice](https://www.researchgate.net/publication/225818833_Rooting_of_microcuttings_Theory_and_practice), 16. srpnja, 2018.

<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.4141/CJPS10131#.W2mRsdIzaHs>, 20. srpnja, 2018.

[https://books.google.hr/books?id=aZzpCAAQBAJ&pg=PA262&lpg=PA262&dq=\(Heyerdahl+et+al.,+1995\)&source=bl&ots=nkGxVIUydz&sig=XzEIfQMO2TufVhmUaWDa4xPFCcw&hl=hr&sa=X&ved=2ahUKEwigiJathdvcAhXFKFAKHUNnDkEQ6AEwBXoECAUQAQ#v=onepage&q=\(Heyerdahl%20et%20al.%2C%201995\)&f=false](https://books.google.hr/books?id=aZzpCAAQBAJ&pg=PA262&lpg=PA262&dq=(Heyerdahl+et+al.,+1995)&source=bl&ots=nkGxVIUydz&sig=XzEIfQMO2TufVhmUaWDa4xPFCcw&hl=hr&sa=X&ved=2ahUKEwigiJathdvcAhXFKFAKHUNnDkEQ6AEwBXoECAUQAQ#v=onepage&q=(Heyerdahl%20et%20al.%2C%201995)&f=false), 21. srpnja, 2018.

[http://publications.cirad.fr/une\\_notice.php?dk=508354](http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=508354), 21. srpnja, 2018.

[https://www.researchgate.net/publication/309531277\\_New\\_protocol\\_for\\_in\\_vitro\\_propagation\\_of\\_berry\\_plants\\_by\\_tis\\_bioreactor](https://www.researchgate.net/publication/309531277_New_protocol_for_in_vitro_propagation_of_berry_plants_by_tis_bioreactor), 21. srpnja, 2018.

[https://www.researchgate.net/publication/257148255\\_Establishment\\_of\\_photomixotrophic\\_cultures\\_for\\_raspberry\\_micropropagation\\_in\\_Temporary\\_Immersion\\_Bioreactors\\_TIBs](https://www.researchgate.net/publication/257148255_Establishment_of_photomixotrophic_cultures_for_raspberry_micropropagation_in_Temporary_Immersion_Bioreactors_TIBs), 22. srpnja, 2018.

<https://www.bib.irb.hr/938727>, 22. srpnja, 2018.

[https://en.wikipedia.org/wiki/Murashige\\_and\\_Skoog\\_medium](https://en.wikipedia.org/wiki/Murashige_and_Skoog_medium), 22. srpnja, 2018.

[https://www.researchgate.net/publication/235909861\\_In\\_vitro\\_propagation\\_of\\_Paradox\\_Walnut\\_root\\_stock](https://www.researchgate.net/publication/235909861_In_vitro_propagation_of_Paradox_Walnut_root_stock), 23. srpnja, 2018.

[https://www.researchgate.net/publication/235909861\\_In\\_vitro\\_propagation\\_of\\_Paradox\\_Walnut\\_root\\_stock](https://www.researchgate.net/publication/235909861_In_vitro_propagation_of_Paradox_Walnut_root_stock), 24. srpnja, 2018.

<https://en.wikipedia.org/wiki/EDDHA>, 24. srpnja, 2018.

[https://en.wikipedia.org/wiki/Ethylenediaminetetraacetic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Ethylenediaminetetraacetic_acid), 25. srpnja, 2018.

<https://slideheaven.com/automation-of-plant-propagation.html>, 25. srpnja, 2018.

<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BG2011000340>, 27 srpnja, 2018.

<https://www.scribd.com/document/334159442/Are-Nci-Bia-2013>, 29. srpnja, 2018.

## 8. SAŽETAK

Osjetljivost maline (*Rubus idaeus* L.) na virusna oboljenja naglašava potrebu njenog razmnožavanja u kulturi tkiva *in vitro* – bezvirusni sadni materijal. Konvencionalni *in vitro* model mikropropagacije limitiran je uporabom polučvrstih hranjivih medija bez mogućnosti ventilacije i kontrole vitrifikacije. Cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnost optimizacije i standardizacije protokola mikropropagacije maline uporabom imerznih bioreaktora (TIB) nove generacije uz modifikaciju mineralnih komponenti medija. Istraživanje je provedeno u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva pri Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. U istraživanju su korištene hranjive podloge MS i DKW s različitim kelatnim oblicima željeza. Tretman s modificiranom MS podlogom (MS(m)) sadržavao je kelatni oblik željeza FeEDDHA. Tretman DKW FeNaEDTA sadržavao je standardnu formulaciju DKW podloge s kelatnim oblikom željeza FeNaEDTA, te tretman DKW FeEDDHA standardnu formulaciju DKW podloge s kelatnim oblikom željeza FeEDDHA. Uspoređivan je i sustav imerznih bioreaktora koji koristi tekući medij s konvencionalnim *in vitro* modelom proizvodnje na polučvrstom mediju (agar). Praćeni su sljedeći parametri: morfološke karakteristike biljaka, stopa multiplikacija i pH tekućeg medija. Tretman s modificiranim MS medijem (MSm) i kelatnim oblikom željeza EDDHA rezultirao je značajno većim listovima i biljkama te brojem listova, odnosno ukupna vegetativna masa na oba sustava (TIB i konvencionalni) pri tretmanu MS(m) FeEDDHA bila je bolja u odnosu na ostale tretmane s DKW medijem. Stopa multiplikacije na polučvrstom mediju pri istom tretmanu MS(m) bila je najveća (5.7). Svi promatrani parametri na biljkama (visina biljaka, broj listova, broj stabljika, dužina i širina lista) bili su značajno veći na tekućem mediju. Imerzni sustav opravdao je recentne navode o svojoj učinkovitosti u skraćenju proizvodnog ciklusa (15 dana) i značajno boljim morfološkim parametrima (broj i veličina listova, broj izdanaka) ali multiplikacija je izostala. Jedini uočeni nedostatak kod sustava s tekućim medijem je stabilizacija pH. Uporaba MS medija s modifikacijom mezo komponenti makro hraniva ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  i  $\text{CaCl}_2$ ) uz upotrebu željeznog kelata EDDHA sa sigurnošću možemo reći da je vrlo učinkovita u mikropropagaciji maline.

## 9. SUMMARY

The sensitivity of raspberry (*Rubus idaeus L.*) to viral diseases emphasizes need for her propagation in tissue culture (virus-free plant material). The conventional *in vitro* model of micropropagation is limited by the use of semi-solid media without possibility of ventilation and hyperhydricity control. The aim of this graduate thesis was to investigate the possibility of optimization and standardization of the micropropagation protocol for raspberry by using a new generation of immersion bioreactors (TIB) with the modification of mineral components in certain media. The research was carried out at the Tissue Culture Laboratory within the Chair of Pomology, Viticulture and Enology at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek. Growing media MS and DKW was used in the study with different chelating forms of iron. The modified MS media treatment (MS (m)) contained the chelating form of iron FeEDDHA. The DKW FeNaEDTA treatment contained a standard formulation of the DKW salts with the chelating form of iron FeNaEDTA and the DKW FeEDDHA treatment also contained DKW base salts with the chelating form of iron FeEDDHA. The system of immersion bioreactors that utilizes liquid media with conventional *in vitro* production model on solid medium (agar) has also been compared. The following parameters were observed: morphological characteristics of the plants, multiplication rate and the pH of the liquid medium. The treatment with modified MS medium (MSm) and chelating form of EDDHA iron resulted in significantly bigger leaves and plants, as well as the number of leaves; respectively the total vegetative mass of both systems (TIB and conventional) in the treatment of MS (m) FeEDDHA was better compared to other treatments with the DKW media. Multiplication rate on semi solid medium in the same treatment of MS (m) was the biggest (5.7). All the observed plant parameters (plant height, number of leaves, number of shoots, length and width of leaves) were significantly bigger on the liquid medium system. The immersion system justified the recent findings regarding its efficiency in shortening the production cycle (15 days) as well as regarding the significantly better morphological parameters (number and leaf size, number of outputs), but multiplication didn't occur. The only observed deficiency in the liquid media system is the pH stabilization. The use of MS medium with the modification of the macro-nutrient meso components (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub>) with the use of the EDDHA chelating iron can safely be said to be very effective in raspberry micropropagation.

## 10. POPIS TABLICA

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablica 1. Tablični prikaz tretmana u istraživanju.....                                                                                                                                 | 28 |
| Tablica 2. Sastav hranjive podloge MS(m) u istraživanju (tretman MSm).....                                                                                                              | 29 |
| Tablica 3. Sastav hranjive podloge DKW u istraživanju (tretmani DKW FeEDTA i tretman DKW FeEDDH).....                                                                                   | 30 |
| Tablica 4. Kretanje pH vrijednosti na tretmanima s tekućim medijem.....                                                                                                                 | 35 |
| Tablica 5. Multiplikacija biljaka na polučvrstom mediju.....                                                                                                                            | 36 |
| Tablica 6. Multiplikacija biljaka na tekućem mediju.....                                                                                                                                | 39 |
| Tablica 7. Statističke razlike na razini pokusa unutar tretmana i sustava te interakcija tretman x sustav za parametre visina, broj listova, broj stabljika, dužina i širina lista..... | 44 |
| Tablica 8. Razlike između tretmana (MS(m) FeEDDHA, DKW FeNaEDTA i DKW FeEDDHA) unutar konvencionalnog <i>in vitro</i> modela (polučvrsti medij).....                                    | 44 |
| Tablica 9. Razlike između tretmana (MS(m) FeEDDHA, DKW FeNaEDTA i DKW FeEDDHA) unutar imerznog TIB sustava (tekući medij).....                                                          | 45 |
| Tablica 10. Razlike između sustava (polučvrsti i tekući medij) unutar tretmana DKW FeEDDHA, DKW FeNaEDTA i MS(m) FeEDDHA.....                                                           | 46 |

## 11. POPIS SLIKA

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1. Crvena malina - <i>Rubus idaeus</i> L.....                                                                                                                                  | 2  |
| Slika 2. Crna malina - <i>Rubus occidentalis</i> L.....                                                                                                                              | 3  |
| Slika 3. Ljubičasta ili purpurna malina - <i>Rubus neglectus</i> Peck.....                                                                                                           | 3  |
| Slika 4. Korijen maline.....                                                                                                                                                         | 7  |
| Slika 5. Stabljika/izdanci maline.....                                                                                                                                               | 9  |
| Slika 6. Lice (lijevo) i naličje lista (desno) maline.....                                                                                                                           | 10 |
| Slika 7. Cvijet maline.....                                                                                                                                                          | 10 |
| Slika 8. Sjemenke maline.....                                                                                                                                                        | 11 |
| Slika 9. Plod maline.....                                                                                                                                                            | 12 |
| Slika 10. Uvođenje eksplantata maline u kulturu tkiva – <i>in vitro</i> .....                                                                                                        | 14 |
| Slika 11. Multiplikacija eksplantata maline <i>in vitro</i> .....                                                                                                                    | 16 |
| Slika 12. Ukorjenjavanje/rizogeneza eksplantata maline <i>in vitro</i> .....                                                                                                         | 17 |
| Slika 13. Aklimatizacija maline FAZOS.....                                                                                                                                           | 19 |
| Slika 14. Imerzni bioreaktor - posuda za biljke (gornja) i za medij (donja).....                                                                                                     | 21 |
| Slika 15. TIB sustav na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek – Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo – lijevo kontrolna jedinica, desno TIB sustav bioreaktora..... | 22 |
| Slika 16. Klima komora s biljnim materijalom, matičnjak i prostor za aklimatizaciju – FAZOS.....                                                                                     | 25 |
| Slika 17. Izgled plodova licenciranog kultivara Himbo Top®.....                                                                                                                      | 27 |
| Slika 18. Tretmani u istraživanju – konvencionalni i imerni TIB sustav.....                                                                                                          | 28 |
| Slika 19. EDDHA FERRIC.....                                                                                                                                                          | 30 |
| Slika 20. FeNaEDTA.....                                                                                                                                                              | 31 |
| Slika 21. TIB sustav - tekući medij.....                                                                                                                                             | 32 |



|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 22. Morfološka mjerenja u istraživanju.....                                                                           | 33 |
| Slika 23. Vizualizacija i mjerenje pH tekućeg medija na TIB sustavu.....                                                    | 33 |
| Slika 24. Tretman DKW FeNaEDTA nakon 7 dana.....                                                                            | 34 |
| Slika 25. Tretman MS(m) FeEDDHA nakon 7 dana.....                                                                           | 34 |
| Slika 26. Biljke u TIB sustavu - Tretman MS(m) FeEDDHA lijevo i tretman DKW<br>FeNaEDTA desno s rubnim nekrozama lista..... | 35 |
| Slika 27. Multiplikacija na tretmanima s polučvrstim medijem.....                                                           | 37 |
| Slika 28. Multiplikacija na tretmanima s tekućim medijem.....                                                               | 38 |

## 12. POPIS GRAFIKONA

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Grafikon 1. Svjetska proizvodnja maline za 2016. godinu u tonama.....                      | 4  |
| Grafikon 2. Trend povećanja svjetske proizvodnje maline, 1961. do 2016. godina.....        | 5  |
| Grafikon 3. Trend proizvodnje maline u RH, 1999. do 2016. godine.....                      | 6  |
| Grafikon 4. Prinos maline po hektaru od 1992. do 2016. godine u RH.....                    | 6  |
| Grafikon 5. Grafički prikaz multiplikacije na polučvrstom mediju.....                      | 36 |
| Grafikon 6. Grafički prikaz multiplikacije na tekućem mediju TIB sustav.....               | 39 |
| Grafikon 7. Grafički prikaz broja stabljika/izdanaka za tretmane na polučvrstom mediju.... | 40 |
| Grafikon 8. Grafički prikaz broja listova za tretmane na polučvrstom mediju.....           | 40 |
| Grafikon 9. Grafički prikaz dužine i širine lista za tretmane na polučvrstom mediju.....   | 41 |
| Grafikon 10. Grafički prikaz broja stabljika/izdanaka za tretmane na tekućem mediju.....   | 41 |
| Grafikon 11. Grafički prikaz broja listova za tretmane na tekućem mediju.....              | 42 |
| Grafikon 12. Grafički prikaz dužine i širine lista za tretmane na tekućem mediju.....      | 42 |

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

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

Diplomski rad

## MIKROPROPAGACIJA MALINE (*Rubus idaeus* L.) U TEKUĆEM IMERZNOM SUSTAVU

Ivana Jaredić

**Sažetak:** Osjetljivost maline (*Rubus idaeus* L.) na virusna oboljenja naglašava potrebu njenog razmnožavanja u kulturi tkiva *in vitro* – bezvirusni sadni materijal. Konvencionalni *in vitro* model mikropropagacije limitiran je uporabom polučvrstih hranjivih medija bez mogućnosti ventilacije i kontrole vitifikacije. Cilj ovog diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnost optimizacije i standardizacije protokola mikropropagacije maline uporabom imerznih bioreaktora (TIB) nove generacije uz modifikaciju mineralnih komponenti medija. Istraživanje je provedeno u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva pri Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. U istraživanju su korištene hranjive podloge MS i DKW s različitim kelatnim oblicima željeza. Tretman s modificiranom MS podlogom (MS(m)) sadržavao je kelatni oblik željeza FeEDDHA. Tretman DKW FeNaEDTA sadržavao je standardnu formulu DKW podloge s kelatnim oblikom željeza FeNaEDTA, te tretman DKW FeEDDHA standardnu formulu DKW podloge s kelatnim oblikom željeza FeEDDHA. Uspoređivan je i sustav imerznih bioreaktora koji koristi tekući medij s konvencionalnim *in vitro* modelom proizvodnje na polučvrstom mediju (agar). Praćeni su sljedeći parametri: morfološke karakteristike biljaka, stopa multiplikacija i pH tekućeg medija. Tretman s modificiranim MS medijem (MSm) i kelatnim oblikom željeza EDDHA rezultirao je značajno većim listovima i biljkama te brojem listova, odnosno ukupna vegetativna masa na oba sustava (TIB i konvencionalni) pri tretmanu MS(m) FeEDDHA bila je bolja u odnosu na ostale tretmane s DKW medijem. Stopa multiplikacije na polučvrstom mediju pri istom tretmanu MS(m) bila je najveća (5.7). Svi promatrani parametri na biljkama (visina biljaka, broj listova, broj stabljika, dužina i širina lista) bili su značajno veći na tekućem mediju. Imerzni sustav opravdao je recentne navode o svojoj učinkovitosti u skraćanju proizvodnog ciklusa (15 dana) i značajno boljim morfološkim parametrima (broj i veličina listova, broj izdanaka) ali multiplikacija je izostala. Jedini uočeni nedostatak kod sustava s tekućim medijem je stabilizacija pH. Uporaba MS medija s modifikacijom mezo komponenti makro hraniva (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> i CaCl<sub>2</sub>) uz upotrebu željeznog kelata EDDHA sa sigurnošću možemo reći da je vrlo učinkovita u mikropropagaciji maline.

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijeku

**Mentor:** Izv. Prof. dr. sc. Aleksandar Stanisavljević

**Broj stranica:** 68

**Broj grafikona i slika:** 40

**Broj tablica:** 10

**Broj literaturnih navoda:** 62

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** malina, mikropropagacija, FeEDDHA, MS, TIB sustav

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. izv.prof.dr.sc. Brigita Popović, predsjednik
2. izv.prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor
3. doc.dr.sc. Dejan Agić, član

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

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

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

**Graduate work**

### **MICROPROPAGATION OF RASPBERRY (*Rubus idaeus L.*) IN LIQUID IMMERSION SYSTEM**

Ivana Jaredić

**Abstract:** The sensitivity of raspberry (*Rubus idaeus L.*) to viral diseases emphasizes need for her propagation in tissue culture (virus-free plant material). The conventional *in vitro* model of micropropagation is limited by the use of semi-solid media without possibility of ventilation and hyperhydricity control. The aim of this graduate thesis was to investigate the possibility of optimization and standardization of the micropropagation protocol for raspberry by using a new generation of immersion bioreactors (TIB) with the modification of mineral components in certain media. The research was carried out at the Tissue Culture Laboratory within the Chair of Pomology, Viticulture and Enology at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek. Growing media MS and DKW was used in the study with different chelating forms of iron. The modified MS media treatment (MS (m)) contained the chelating form of iron FeEDDHA. The DKW FeNaEDTA treatment contained a standard formulation of the DKW salts with the chelating form of iron FeNaEDTA and the DKW FeEDDHA treatment also contained DKW base salts with the chelating form of iron FeEDDHA. The system of immersion bioreactors that utilizes liquid media with conventional *in vitro* production model on solid medium (agar) has also been compared. The following parameters were observed: morphological characteristics of the plants, multiplication rate and the pH of the liquid medium. The treatment with modified MS medium (MSm) and chelating form of EDDHA iron resulted in significantly bigger leaves and plants, as well as the number of leaves; respectively the total vegetative mass of both systems (TIB and conventional) in the treatment of MS (m) FeEDDHA was better compared to other treatments with the DKW media. Multiplication rate on semi solid medium in the same treatment of MS (m) was the biggest (5.7). All the observed plant parameters (plant height, number of leaves, number of shoots, length and width of leaves) were significantly bigger on the liquid medium system. The immersion system justified the recent findings regarding its efficiency in shortening the production cycle (15 days) as well as regarding the significantly better morphological parameters (number and leaf size, number of outputs), but multiplication didn't occur. The only observed deficiency in the liquid media system is the pH stabilization. The use of MS medium with the modification of the macro-nutrient meso components (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub>) with the use of the EDDHA chelating iron can safely be said to be very effective in raspberry micropropagation.

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Aleksandar Stanisavljević

**Number of pages:** 68

**Number of figures and pictures:** 40

**Number of tables:** 10

**Number of references:** 62

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** raspberry, micropropagation, FeEDDHA, MS, TIB system

**Reviewers:**

1. Brigita Popović, Ph.D., assoc. prof., president
2. Aleksandar Stanisavljević, Ph.D. assoc. prof., mentor
3. Dejan Agić, asst. prof., member

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