

Utjecaj genetskih i okolišnih razlika na mikropropagaciju divlje trešnje (*Prunus avium* L.)

Brek, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry and Wood Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:617904>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-03**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology](#)



FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
UZGAJANJE I UREĐIVANJE ŠUMA S LOVNIM GOSPODARENJEM

IVANA BRLEK

**UTJECAJ GENETSKIH I OKOLIŠNIH RAZLIKA NA
MIKROPROPAGACIJU DIVLJE TREŠNJE (*Prunus avium* L.)**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2021.

FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK

**UTJECAJ GENETSKIH I OKOLIŠNIH RAZLIKA NA
MIKROPROPAGACIJU DIVLJE TREŠNJE (*Prunus avium* L.)**
DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Uzgajanje i uređivanje šuma s lovnom gospodarenjem

Predmet: Oplemenjivanje šumskog drveća

Ispitno povjerenstvo: 1. Doc. dr. sc. Ida Katičić Bogdan
2. Prof. dr. sc. Davorin Kajba
3. Prof. dr. sc. Marilena Idžojić

Studentica: Ivana Brlek

JMBAG: 0068228811

Broj indeksa: 1038/19

Datum odobrenja teme: 04.05.2021.

Datum predaje rada: 07.09.2021.

Datum obrane rada: 24.09.2021.

Zagreb, rujan, 2021.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Naslov rada	Utjecaj genetskih i okolišnih razlika na mikropropagaciju divlje trešnje (<i>Prunus avium</i> L.)
Title	The effect of genetic and environmental differences on micropropagation of wild cerry (<i>Prunus avium</i> L.)
Autor	Ivana Brlek
Adresa autora	Cerje Tužno 74, 42242 Radovan
Mjesto izrade	Fakultet šumarstva i drvne tehnologije
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	Doc. dr. sc. Ida Katičić Bogdan
Godina objave	2021.
Obujam	Broj stranica: 34, slika: 14, tablica: 3, grafikona: 6
Ključne riječi	mikropropagacija, divlja trešnja, kultura meristema, genetska varijabilnost
Key words	micropropagation, wild cerry, meristem culture, genetic variability
Sažetak	<p>U klonskoj sjemenskoj plantaži u Kutini prikupljeni su izbojci, za potrebe mikropropagacije, uzeti s 9 različitih klonova. Sa svakog klona (stabla) prikupljena su po 4 izbojka s pupovima u fazi dormancij; po jedan izbojak na vrhu i na dnu krošnje sa sjeverne strane svijeta te po jedan izbojak na vrhu i na dnu krošnje sa južne strane svijeta. Prikupljeni izbojci poslužili su kao izvor eksplantata za uvođenje u kulturu tkiva metodom meristema. Sa svakog prikupljenog izbojka u kulturu tkiva je uvedeno po 6 pupova, što ukupno po klonu čini 24 uzorka. Inokulirane kulture svoj su razvoj nastavile u klima komori u razdoblju od 40 dana prilikom čega je praćen njihov razvoj. Cilj rada bio je utvrditi uspješnost i brzinu napretka razvoja biljčica pojedinog klona u kulturi tkiva, s obzirom na poziciju uzetog uzorka u krošnji, kao i razlike u razvoju i preživljenju klonova međusobno, zbog utjecaja genetske raznolikosti.</p>
Abstract	<p>In the clone seed plantation in Kutina, shoots were collected, for micropropagation purposes, taken from 9 different clones. From each clone (tree) were collected 4 shoots with buds in the</p>

	<p>dormancy phase; one shoot at the top and bottom of the canopy on the north side of the world and one shoot at the top and bottom of the canopy on the south side of the world. The collected shoots served as a source of explants for introduction into tissue culture by the meristem method. From each collected shoot, 6 buds were introduced into the tissue culture, which makes a total of 24 samples per clone. Inoculated cultures continued their development in the climate chamber for a period of 40 days, during which their development was monitored. The aim of this study was to determine the success and speed of progress in the development of individual clone plants in tissue culture, given the position of the sample taken in the canopy, as differences in the development and survival of clones, due to the influence of genetic diversity.</p>
--	---



**IZJAVA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

OB FŠDT 05 07

Revizija: 2

Datum: 29.04.2021.

„Izjavljujem da je moj diplomski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni“.

U Zagrebu, 24. rujna 2021. godine

vlastoručni potpis

Ivana Brlek

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Cilj rada	2
3. Pregled literature	3
3.1. Vegetativno razmnožavanje	3
3.2. Mikropropagacija	5
3.3 Tipovi kultura	8
3.4. Kultura meristema	8
3.5. Uspješnost mikropropagacije	10
3.6. Prednosti i nedostaci mikropropagacije	12
3.7. Biljni hormoni	13
4. Divlja trešnja (<i>Prunus avium</i> L.)	14
5. Materijal i metode	17
5.1. Prikupljanje uzoraka	18
5.2 Uvođenje pupova u kulturu tkiva	19
5.3. Sastav hranidbene podloge	22
5.4. Ocjenjivanje razvoja pupova	23
5.5. Statistička analiza	25
6. Rezultati	26
7. Rasprava	32
8. Zaključak	34
9. Literatura	35

POPIS SLIKA

Slika 1. Laminar s horizontalnim strujanjem zraka

Slika 2. Shematski prikaz kulture meristema iz pupa

Slika 3. Gradijent juvenilnosti drvenastih vrsta

Slika 4. Areal divlje trešnje

Slika 5. Stablo divlje trešnje u cvatu

Slika 6. Pupovi divlje trešnje

Slika 7. Plodovi divlje trešnje

Slika 8. Klonska sjemenska plantaža divlje trešnje kraj Kutine

Slike 9. Uzimanje izbojaka s vrha krošnje

Slika 10. Uzimanje izbojaka s dna krošnje

Slika 11. Izrezani segment s pupom spreman na uklanjanje listića

Slika 12. Pupovi divlje trešnje uvedeni u kulturu tkiva (Bogunović 2021)

Slika 13. Inokulirane kulture u klima komori (foto: Bogunović 2021)

Slika 14. Biljčice u fazama 1, 2 i 3

POPIS TABLICA I GRAFOVA

Tablica 1. Sastav hranidbene podloge

Tablica 2 – pripadnost klonova grupama po Wilcoxon-ovom rank sum testu

Tablica 3 – pripadnost klonova grupama po Wilcoxon-ovom rank sum testu

Grafikon 1 – Srednje vrijednosti i standardne devijacije svojstva rasta biljčica na 40. dan od uvođenja u kulturu tkiva po klonovima

Grafikon 2 – Srednje vrijednosti svojstva rasta biljčica na 40. dan od uvođenja u kulturu tkiva po klonovima i stranama svijeta

Grafikon 3 – Srednje vrijednosti svojstva rasta biljčica na 40. dan od uvođenja u kulturu tkiva po klonovima i položaju u krošnji

Grafikon 4 – Preživljenje biljčica po klonovima

Grafikon 5 – Preživljenje biljčica po klonovima i stranama svijeta

Grafikon 6 – Preživljenje biljčica po klonovima i položaju u krošnji

Zahvala

Zahvaljujem mentorici Doc.dr. sc. Idi Katičić Bogdan na pomoći i vodstvu pri izradi diplomskog rada.

Također zahvaljujem dr.sc. Sanji Bogunović na ustupljenim materijalima i izvrsnoj suradnji prilikom rada u laboratoriju za kulturu tkiva, na Hrvatskom šumarskom institutu u Jastrebarskom.

1.Uvod

Mikropropagacija je posebna tehnika vegetativnog razmnožavanja biljaka uz pomoć malih dijelova biljnoga tkiva (eksplantata) ili stanica roditeljske biljke na specijaliziranim hranidbenim podlogama, kojom se nastoje proizvesti zdrave presadnice (Paradžiković 2014). Uzgojem i manipulacijom inokuliranih biljnih tkiva na hranidbenim podlogama, u strogo sterilnim uvjetima, moguće je regenerirati novu biljku genetski istovjetnih svojstava roditeljskoj. Sama metoda temelji se na svojstvu totipotentnosti stanice što označava sposobnost stanice da se dijeli i proizvodi sve diferencirane stanice nekog organizma (Wikipedija, Stanična potentnost). Postoje neke porodice i rodovi biljaka koje imaju veliki kapacitet za regeneraciju. Među njima su rodovi *Nicotiana*, *Petunia* i *Datura* iz porodice *Solanaceae*, rodovi *Brassica* i *Arabidopsis* iz porodice *Brassicaceae*, rod *Achimenes* te rodovi *Lilium* i *Allium* iz porodice *Liliaceae* i mnogi drugi. Za razliku od navedenog postoje vrste koje se teško mogu razmnožavati mikropropagacijom, a primjer su vrste iz porodice *Malvaceae* i *Chenopodiaceae* (Yildiz 2012). U navedenim primjerima pretežno se radi o zeljastim biljnim vrstama čije je zakorjenjivanje mnogo lakše od drvenastih vrsta, upravo zbog neodrvjenjelih tkiva koja imaju veću vitalnost od starih biljnih tkiva (Paradžiković 2014).

Budući da bi šumska staništa trebala čuvati genetsku raznolikost, uporabom generativno proizvedenih sadnica, klonirane se sadnice ne smatraju prikladnima za pošumljavanje (Rathore i sur. 2005). Unatoč navedenom, metoda mikropropagacije može biti korisna tehnika pri oplemenjivanju drvenastih vrsta kao što je divlja trešnja (*Prunus avium* L.). Navedena je vrsta posebno cijenjena zbog plemenitog i visokovrijednog drva. Zbog neredovitih periodičnih uroda sjemena i otežane obnove divlje trešnje, u sastojinama se vrši selekcija plus stabala čijim se reznicama (cijepljenje) osnivaju plantaže za dobivanje sjemena. Budući da je i u klonskim plantažama, zbog ovisnosti o vremenskom prilikama, teško osigurati dovoljne količine sjemena, u sve je većoj primjeni metoda mikropropagacije kojom sa nastoji na najbrži način osigurati proizvodnja sadnica elitnih genotipova, spremnih za pošumljavanje. Navedenom metodom moguće je očuvati genetsku konstituciju biljnog materijala bez

promjena (mutacija), a isto tako proizvesti i bezvirusni biljni materijal (Tančeva Crmarić i Kajba 2016).

2. Cilj rada

Za potrebe istraživanja u sjemenskoj plantaži Polojec – Šartovac kod Kutine su u ožujku 2021. godine prikupljeni izbojci s nabubrenim pupovima u fazi dormancije. Na navedenoj plantaži je izabrano 9 klonova (stabala) divlje trešnje, s kojih su uzimani izbojci. Sa svakog klona uzeta su po 4 uzorka grančica s pupovima. Po jedan pri vrhu i dnu krošnje sa sjeverne strane svijeta te po jedan pri vrhu i dnu krošnje na južnoj strani svijeta. Prikupljeni materijali (pupovi), poslužili su kao izvor eksplantata koji su metodom kulture meristema uvedeni u kulturu tkiva. Na temelju praćenja razvoja eksplantata uvedenih u kulturu, cilj rada bio je utvrditi uspješnost i brzinu napretka razvoja biljčica pojedinog klona u kulturi tkiva, s obzirom na poziciju uzetog uzorka u krošnji, što se odnosilo na stranu svijeta (sjever ili jug) te na poziciju izbojaka s pupovima u krošnji (dno ili vrh krošnje). Uz navedeno se promatralo i preživljenje pojedinih klonova s obzirom na poziciju u krošnji i stranu svijeta te superiornost pojedinog klona.

Podaci iz literature pokazuju kako je donji dio krošnje vitalniji u odnosu na gornji zbog čega bi uspješnost regeneracije eksplantata uzetih iz bazalnog dijela krošnje stabla, trebala biti veća od onih uzetih na vrhu krošnje. Prema istraživanju Sancheza i Vieiteza (1990) izbojci pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.), iz bazalnog dijela krošnje su imali veći kapacitet za *in vitro* zasnivanje, razmnožavanje i ukorjenjivanje od onih uzetih u kruni krošnje. Istraživanje Minghe i Faxin (2000) je također pokazalo da su se plemke kuningamije (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.) za cijepljenje uzete iz gornjeg dijela krošnje teže zakorjenjivale od onih u bazalnom dijelu krošnje. Pritom smatraju da je razlog tome, razlika u vigoru između gornjih i bazalnih grana. Mikropropagacija duglazije (*Pseudotsuga menziesi* (Mirb.) Franco) također je pokazala da su stanice tkiva dijelova stabla na višem položaju, starije od onih u bazalnom dijelu stabla, što navodi Evers (1984) (prema: Jelaska 1994).

Na temelju podataka iz literature može se pretpostaviti kako će se biljčice uvedene u kulturu porijeklom s fiziološki mlađeg dijela krošnje, odnosno njenog dna, bolje razvijati od onih s vrha krošnje.

Budući da podaci iz literature pokazuju da se genotipovi međusobno razlikuju u uspješnosti mikropropagacije, zbog razlika u uvjetima za optimalni rast i genetičke varijabilnosti, mogu se pretpostaviti i razlike u uspješnosti mikropropagacije pojedinog genotipa. Genetska struktura nekog organizma, odnosno svi njegovi geni čine genotip. Zbog utjecaja okoliša isti genotipovi se mogu razlikovati po svojim svojstvima, pa međudjelovanje genotipa i okoliša čini fenotip (Wikipedija, Genotip). Pojam genetička varijabilnost (genetička raznolikost) označava mjeru tendencije individualnih genotipova u populaciji da se međusobno razlikuju, a posebno je važna za očuvanje biološke raznolikosti. Sama varijabilnost neke osobine proizlazi iz genetskog utjecaja i faktora životne sredine (okoliša). Zahvaljujući genetskoj varijabilnosti jedinke i populacije se mogu prilagođavati promjenama, što je posebno važno u procesu evolucije. Na taj način jedinke daju svoj odgovor na stres iz okoliša, što u konačnici omogućuje opstanak organizama u populaciji (Wikipedija, Genetička varijabilnost).

3. Pregled literature

3.1. Vegetativno razmnožavanje

Razmnožavanje živih organizama jedno je od najznačajnijih svojstava koje omogućuje održavanje vrste te prijenosa nasljedne tvari na njezino potomstvo. (Kajba 2014). Uz spolno (generativno) razmnožavanje, koje zahvaljujući mehanizama rekombinacije omogućuje veliku raznolikost živih organizama, biljni organizmi posjeduju i sposobnost nespolnog, odnosno vegetativnog razmnožavanja. Odlika vegetativnog razmnožavanja je sposobnost biljaka da iz svojih vegetativnih organa ili tjelesnih stanica mogu razviti nove jedinke, genetski istovjetnog materijala. (Kajba 2014).

U šumarskoj se proizvodnji metode vegetativnog razmnožavanja dijele na tehnike makropropagacije i mikropropagacije. Tehnici makropropagacije pripada

autovegetativan i heterovegetativan način razmnožavanja. Prvi se način odnosi na vegetativno razmnožavanje biljaka putem njihovih vegetativnih organa kao što su stabljika i korijen, dok drugi način podrazumijeva primjenu podzemnog biljnog organa (korijena - hipobiont), na koji se transplantira nadzemni dio biljke (plemka - epibiont) drugačije genetske konstitucije od korijena pa se navedena metoda naziva cijepljenjem (kalemljenje). Posebna tehnika vegetativnog razmnožavanja biljaka pomoću njihovih sitnih organa ili komadića tkiva, u strogo kontroliranim uvjetima, se naziva mikropropagacija ili kultura biljnih tkiva i stanica (Jelaska 1994).

Budući da jedinke nastale vegetativnim razmnožavanjem imaju istu genetsku konstituciju kao i njihov predak od kojeg su potekle, nazivaju se klonovima. Samim time se provodi postupak kloniranja, koji prema definiciji u širem smislu označava oblik nespolnog načina razmnožavanja jednostaničnih ili višestaničnih organizama pri čemu nastaju potomci jednaki roditeljskom organizmu (Wikipedija, Kloniranje). Pritom se matična biljka naziva ortetom, a svi njezini potomci nazivaju se ramete. Ukoliko se klonovi uzgajaju u jednakim uvjetima kao i matična biljka (orteta), njihova će morfološka i fiziološka svojstva biti jednaka majčinskoj biljci. (Ballian i Kajba 2011). Prednost kloniranja biljaka kao metode vegetativnog razmnožavanja proizlazi iz mogućnosti zadržavanja pozitivnih fenotipskih svojstava prilikom kloniranja, koja se ne bi mogla očuvati generativnim razmnožavanjem. Kloniranjem je također moguće očuvati poželjna fenotipska svojstva organizama nastala mutacijama u prirodi te ih trajno fiksirati. Obično se na taj način komercijalno uzgajaju dekorativne vrste u hortikulturi. Iako se u šumarstvu teži očuvanju genetske raznolikosti, jedna od svrha kloniranja biljaka u šumarstvu je mogućnost njihovog oplemenjivanja, odnosno razmnožavanje selekcioniranih superiornih jedinki pozitivnih fenotipskih svojstava s ciljem povećanja njihove proizvodnosti, otpornosti prema abiotičkim i patogenim organizama, konzerviranja ugroženih vrsta te radi provođenja znanstvenih istraživanja (Ballian i Kajba 2011).

3.2. Mikropropagacija

Jedna od metoda vegetativnog razmnožavanja biljaka putem sitnih komadića tkiva ili biljnih stanica naziva se mikropropagacija ili kultura biljnih tkiva i stanica. Radi se o metodi koja se razlikuje od tradicionalnog načina proizvodnje biljnog materijala, jer se biljke razmnožavaju iz sitnih dijelova vegetativnih organa ili stanica u strogo kontroliranim uvjetima. Uzgoj biljaka metodom mikropropagacije mogući je jedino u sterilnim uvjetima, na specijaliziranim hranidbenim podlogama u epruvetama ili drugim staklenim posudama zbog čega je jedan od sinonima za navedenu metodu, naziv kultura *in vitro* (lat. u staklu) (Wikipedija, *In vitro*). Počeci razvoja metode kulture tkiva vežu se uz 1934. godinu kada su White i Gautheret iznijeli svoje radove s odgovorima na pitanja o hranidbenim potrebama biljaka i osnovama trajne kalusne kulture, a velik je napredak postignut 1962. godine kada su Morashige i Skoog sintetizirali prvi hranjivi medij kojim su regenerirali cijelu biljku duhana. (Marijanović i sur. 2000).

U današnje vrijeme, tehnika kulture biljnog tkiva ima velik značaj u rješavanju problema u botaničkim znanostima, pa se primjenjuje u mnogim područjima kao što su biokemija, fiziologija, genetika i molekularna biologija, a posebnu primjenu je našla i pri očuvanju ugroženih i rijetkih biljnih vrsta i biljnog genofonda. Zbog navedenog se primjenjuje u procesu oplemenjivanja poljoprivrednih te hortikulturnih vrsta i drugih drvenastih biljaka, a ujedno je i sastavni dio biotehnologije. (Jelaska 1994).

Provođenje mikropropagacije podrazumijeva rad u laminaru. Laminar je uređaj (komora) kroz koji struji sterilni zrak u horizontalnom smjeru. Budući da uređaj sadrži filtere koji zadržavaju mikroorganizme, radom pod ovim uređajem se sprječava kontaminacija hranidbene podloge prilikom procesa inokulacije i osigurava se rad u sterilnim uvjetima. Sastavni dio laminara su i UV lampe koje doprinose sterilizaciji prostora jer se uključuju sat vremena prije početka rada. (Pintarić 2008)



Slika 1. Laminar s horizontalnim strujanjem zraka

(izvor: <https://www.telstar.com/lab-hospitals-equipment/laminar-flow-cabinets/vertical-aeolus-v/>, 19.08. 2021.)

Prema Pintarić (2008) faze mikropropagacije u laminaru su:

1. Obrada biljnog materijala
2. Multiplikacija izbojcima
3. Izduživanje izbojaka
4. Zakorjenjivanje i
5. Aklimatizacija

1. Obrada biljnog materijala

Ova se faza odnosi na obradu površinski steriliziranog biljnog materijala za inokulaciju. Obično se odnosi na premještanje sterilnog biljnog materijala na sterilnu podlogu te njegovo isijecanje i uklanjanje vanjskih listića, ukoliko se radi o pupovima.

2. Multiplikacija izbojaka

Ovom fazom se potiče slobodno izduživanje aksilarnih pupoljaka, a u tu se svrhu koriste hranidbene podloge s citokininima. Navedena faza traje od 4-5 tjedana sve dok kulture ne potroše sav medij u kojem rastu. Tijekom tog razdoblja, iz pojedinačnog pupoljka koji je uveden u kulturu, razvijaju se novi pupoljci koji se ponovno mogu koristiti kao eksplantati. Prosječan broj novih pupoljaka koji se tijekom subkulture razvije iz jednog pupoljka je osnovni parametar multiplikacije i naziva se indeksom multiplikacije.

3. Izduživanje izbojaka

Radi se o međufazi između multiplikacije i zakorjenjivanja (elongacije), a njezina je svrha omogućiti dovoljno dugačke izbojke za fazu ožiljavanja.

4. Ožiljavanje (zakorjenjivanje)

Navedena se faza provodi premještanjem izduženih izbojaka, isijecanjem iz busenova, na posebni podlogu čiji sastav stimulira razvoj korijenja.

5. Aklimatizacija

Aklimatizacija označava posljednju fazu mikropropagacije kojom se biljke pripremaju za presadnju u uvjete na otvorenom. Ožiljene biljke se pritom vade iz posuda u kojima su bile kultivirane. Njihov se korijenov sustav ispiru vodom kako bi se isprao zaostali agar i potom se rasađuju u sterilni supstrat. Biljke se obično sade u kontejnere i pohranjuju se u plastenike ili staklenike gdje borave nekoliko tjedana prije presadnje na otvoreno.

3.3 Tipovi kultura

Iako se naziv kultura biljnog tkiva smatra sinonimom za mikropropagaciju, navedeni naziv označava kultiviranje bilo kojeg biljnog dijela u *in vitro* sterilnim uvjetima. Izolirani dio biljke koji se uvodi u kulturu se naziva eksplantatom. Uvođenjem biljnih dijelova u kulturu (eksplantata) mogu se razlikovati organizirani i neorganizirani tip rasta (Jelaska 1994).

Organizirani tip rasta se javlja uvođenjem organiziranih biljnih organa u kulturu, kao što su vršni meristemi izdanaka ili korijena, lisni zameci, mladi cvjetni pupovi i sitni plodovi. Nakon što se uvedu u kulturu, navedeni biljni dijelovi nastavljaju svoj razvitak uz očuvanje svoje početne strukture ili novim stvaranjem organa (Jelaska 1994).

S obzirom na vrstu eksplantanta postoje različite kulture biljnih organa (Jelaska 1994):

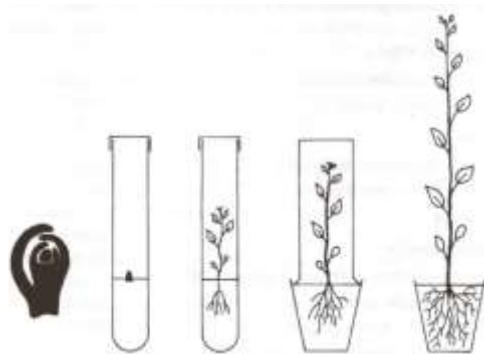
- a) kultura čitavih, intaktnih biljaka
- b) kultura embrija
- c) kultura korijena
- d) kultura antera
- e) kultura meristema
- f) kultura vegetacijskog vrška izdanka (bočni, aksilarni, lateralni pupovi)
- g) kultura pojedinačnih nodija

3.4. Kultura meristema

Tvorna staničja ili meristemi su staničja građena od embrionalnih ili meristemskih stanica sa sposobnošću stvaranja novih staničnih struktura. Pritom se razlikuju primarni meristemi djelovanjem kojih nastaju novi organi i sekundarni meristemi u trajnom staničju pomoću kojih biljni organi rastu u debljinu (postrani ili lateralni meristemi). Primarni se meristemi nalaze u području vegetacijskog vrha stabljike i korijena te omogućuju rast biljke u duljinu pa se zbog navedenog još nazivaju vršnim ili apikalnim meristemima (Franjić i sur. 2008).

Kultura meristema je jedna od *in vitro* metoda, odnosno metoda mikropropagacije, koja omogućuje proizvodnju biljnog materijala bez virusa, čak i uvođenjem zaraženih biljnih dijelova u kulturu meristema. Quak (1994) navodi da stanice meristemske tkiva i virusne čestice vode određenu vrstu suparništva zbog sinteze nukleinskih kiselina, za staničnu diobu, na štetu umnožavanja virusa. Uz navedeno Quak (1994) smatra da je razlog izostanka virusa u vršnim meristemima, rezultat izostanka provodnih elemenata u tom dijelu biljke (Jelaska 1994).

Sama metoda izolacije meristema iz pupa se provodi izolacijom eksplantata biljke u fazi rasta. Pritom se prikupljaju izbojci s pupovima koji se moraju očistiti, tj. sterilizirati i dezinficirati, kako bi se spriječila kontaminacija hranidbene podloge. Meristemske bezvirusno tkivo se izolira, odstranjivanjem ljuski pupova i primordijalnog lista (zametak lista) sve dok se ne izdvoji meristemske tkivo s nekoliko zametnih listića. Za navedenu svrhu se koristi stereomikroskop i sterilna pomagala poput igle i skalpela, naravno u sterilnim uvjetima (laminar). Oslobođeni se meristem sa 1-2 primordijalna lista odreže i inokulira na hranidbenu podlogu. Izolirani meristem pupa svoj razvoj nastavlja u klima komori pri temperaturi zraka od 21 do 25 °C i fluorescentnim svjetlom (duljina dana 14 – 16 sati). Iz izoliranog pupa razvija se izdanak, a presadnjom izdanka na podlogu za razvoj korijena potiče se razvoj korijena biljke. Nakon presadnje u zemljani supstrat i aklimatizacije biljka je spremna za sadnju na otvorenom. (Jelaska 1994).



Slika 2. Shematski prikaz kulture meristema iz pupa

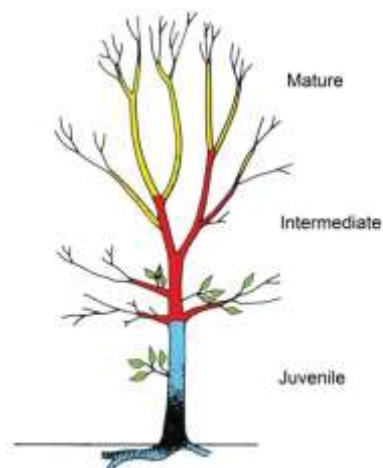
(Izvor:https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fhrcak.srce.hr%2Ffile%2F240690&psig=AOvVaw3J3McuSjFgzraistud2g1C&ust=1627205059927000&source=images&cd=vfe&ved=0CAoQjRxqFwoTCOi3z6ux-_ECFQAAAAAdAAAAABAD)

3.5. Uspješnost mikropropagacije

Uz fizikalne faktore rasta, koji utječu na razvoj kulture u klima komori, poput sastava hranidbene podloge, svjetlosti, svjetlosnog spektra, temperature, vlažnosti zraka, raspoloživosti vode i kisika, na rast biljnog materijala u *in vitro* uvjetima utječu i genotip te fiziološko stanje same biljke davateljice eksplantata.

Istraživanja su pokazala da visoki kapacitet za regeneraciju imaju mlađa embrijska tkiva i dijelovi tkiva juvenilnih biljaka. Zbog navedenog su neodrvnjela biljna tkiva pogodnija za mikropropagaciju od starijih tkiva.

Na uspješnost razvoja kulture tkiva mogu utjecati uvjeti rasta biljke s koje se uzima materijal za mikropropagaciju te položaj eksplantata na biljci. Evers 1984. navodi kako izbojci uzeti što bliže vegetacijskom vršku biljke pokazuju manju mogućnost stvaranja adventivnog korijenja jer su s obzirom na vrijeme njihovog postanka, stanice tkiva dijelova stabla na višem položaju, starije od onih u bazalnom dijelu stabla. (Jelaska 1994). Navedena se pojava naziva ciklofiza. (Klaehn 1962)



Slika 3. Gradijent juvenilnosti drvenastih vrsta

(Izvor: <https://propg.ifas.ufl.edu/03-genetic-selection/17-genetic-phasechange.html>)

Prema Yildizu (2012) na uspješnost mikropropagacije utječu sljedeći čimbenici :

1. Genotip

Sposobnost regeneracije biljaka u širokom je rasponu i razlikuje se između porodica i pojedinih vrsta, a može se razlikovati i unutar genotipova iste vrste. Smatra se da dvosupnice imaju bolji regeneracijski kapacitet od jednosupnica, a isto tako se zeljaste biljke lakše obnavljaju od drveća i grmlja.

2. Fiziološki stadij matične biljke (biljke davatelja eksplantata)

Vegetativni biljni dijelovi lakše se regeneriraju od generativnih biljnih dijelova, a sposobnost regeneracije veća je kod mladih tkiva i biljnih organa.

3. Izvor eksplantata

Biljke uzgajane u staklenicima daju bolje rezultate od biljaka uzgajanih na otvorenom.

4. Starost eksplantata

Regeneracijska sposobnost starije biljke je obično niska. Što su organi biljke, koji se koriste kao izvor eksplantata stariji to je sposobnost umnožavanja biljke manja.

5. Veličina eksplantata

Budući da veći eksplantati poput listova ili hipokotila sadrže veće količine nutritivnih rezervi, lakše se mogu regenerirati *in vitro* uvjetima od sitnih biljnih dijelova poput stanica. Isto tako veći biljni dijelovi zahtijevaju manje količine hranjiva i biljnih hormona.

6. Položaj eksplantata na biljci donoru

Razvoj eksplantata u *in vitro* kulturi može biti pod utjecajem mjesta na biljci gdje prikupljen. Primjerice viši dijelovi biljke, poput vršnih izbojaka u krošnji, smatraju se starijima od onih u bazalnom dijelu biljke. Također se smatra da je razlog navedene pojave veći vigor biljke u njezinom bazalnom dijelu.

7. Površinska sterilizacija eksplantata

Jedan od najznačajnijih čimbenika koji utječe na uspješnost mikropropagacije je zdravstvena ispravnost eksplantata. Pritom je izrazito važan tretman sterilizacije biljnih dijelova prije samog uvođenja u kulturu kako bi se spriječila mogućnost njihove kontaminacije mikroorganizmima kojima su *in vitro* uvjeti pogodni za razvoj. Važno je istaknuti kako dezinfekcija eksplantata ne smije naštetiti živim stanicama.

8. Hranidbena podloga

Hranidbena je podloga iznimno važna za razvoj kulture biljnog tkiva. Ona sadrži mikroelemente, makroelemente, vitamine, aminokiseline, dušične spojeve biljne hormone te druge spojeve i elemente važne za razvoj biljaka.

9. Uvjeti u kulturi tkiva

Nakon što su eksplantati inokulirani na hranidbenu podlogu, svoj razvoj nastavljaju u kontroliranim uvjetima temperature i vlage. Biljke se razvijaju pod fluorescentnim svjetlom u klima komorama sa 16 sati svjetla i 8 sati mraka, pri temperaturi od 21 do 25 °C.

3.6. Prednosti i nedostaci mikropropagacije

U odnosu na klasičan način vegetativnog razmnožavanja, mikropropagacija ima višestruke prednosti. Glavna prednost je mogućnost proizvodnje bezvirusnog materijala i velikog broja biljaka (klonova) u kratkom vremenu, što osobito pogoduje komercijalnoj biljnoj proizvodnji. Ova metoda, također omogućuje i razmnožavanje biljnih vrsta koje se ne mogu proizvesti *in vivo* (u živom) a istom se izbjegava inkompatibilnost reznica kod metode cijepljenja. Prednost mikropropagacije, u odnosu na druge metode, očituje se i u uštedama sredstava koja bi se inače utrošila na zagrijavanje staklenika i drugih prostora te mogućnosti proizvodnje presadnica tijekom cijele godine.

Neki od nedostataka mikropropagacije su teško zakorjenjivanje drvenastih vrsta i mogućnost pokazivanja loših značajki biljaka, prilikom njihove presadnje u *in vivo* uvjete, kao što su grmolik rast ili povratak na juvenilne karakteristike. Biljke proizvedene mikropropagacijom, na otvorenom često mogu pokazivati osjetljivost na pojavu bolesti i štetnika, zbog čega nije preporučljiv uzgoj monoklonskih plantaža. Uz mogućnost gubitka regenerativne sposobnosti biljaka, nakon određenog broja supkultura kalusnog tkiva ili stanica, nedostatak mikropropagacije predstavlja i visoka cijena koštanja rada i opreme potrebne za proizvodnju biljnog materijala. (Regionalni centar za biotehnoška istraživanja i razvoj Brodsko posavske županije, Odjel za biljnu proizvodnju)

3.7. Biljni hormoni

Organske tvar koje biljke sintetiziraju u listu, u procesu organogeneze i pomoću kojih reguliraju sve procese nazivaju se biljnim hormonima. Radi se o organskim tvarima koje utječu na rast i diferencijaciju tkiva i organa s kojima dolaze u dodir. Tri glavne skupine biljnih hormona koji stimuliraju procese su auksini, giberlini i citokinini, dok abscizinska kiselina i etilen djeluju kao inhibitori (Škvorc i sur. 2013).

Za reguliranje rasta i razvoja u mikropropagaciji se najčešće koriste sintetski fitohormoni kojima pripadaju auksini i citokinini. (Zec 2017)

Citokinini

Skupina biljnih hormona koji stimuliraju diobu stanica u procesu citokineze su citokinini. Navedeni se hormoni sintetiziraju u tkivima poput vrškova korijena embrija i ploda. (Škvorc i sur. 2013). Uz navedeno reguliraju rast biljke, njezinih organa i upravljaju mnogim fiziološkim procesima. Najčešći citokinini koji se koriste u sastavu hranidbenih podloga su 6-benzilamiopurin (BAP) i kinetin, a u uporabi su zbog visoke biološke aktivnosti, dostupnosti i niske cijene (Zec 2017).

Auksini

Auksini su hormoni koji stimuliraju produženi rast stanica stanice i koleoptila, a djeluju tako da omogućuju rastezanje rasta stanične stijenke (Škvorc i sur. 2013). Uz navedeno auksini djeluju na sekundarni rast vaskularnog kambija i stimuliraju rast plodova. Posebno su važni u procesu zakorjenjivanja reznica jer na reznoj plohi stabljike potiču stvaranje adventivnog korijenja (Škvorc i sur. 2013).

4. Divlja trešnja (*Prunus avium* L.)

Divlja trešnja (*Prunus avium* L.) je cijenjena autohtona vrsta naših mezofilnih šuma (Agroklub: Divlja trešnja: Cijenjeno drvo za proizvodnju sadnog materijala i očuvanje bioraznolikosti). Radi se o listopadnoj vrsti drveća iz porodice *Rosaceae* (Štetnici Hr, Trešnja (*Prunus avium*)). Karakterizira ju polimorfnost, odnosno velik broj sorti u voćarstvu koje se obično uzgajaju radi dobivanja plodova. Posebnu vrijednost ima i njezino drvo crvenkaste boje koje se koristi za izradu namještaja i glazbenih instrumenata. Područje prirodnog rasprostranjenja divlje trešnje, obuhvaća područje Europe, Male Azije, Krima, Kavkaza, Irana i sjeverne Afrike. Navedena vrsta obitava kao pojedinačno stablo ili manja skupina stabala u šumama ili njihovim rubovima. (Franjić i Škvorc 2010).



Slika 4. Areal divlje trešnje

(Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Prunus-avium-L-distribution-map-62-https-commonswikimediaorg-wiki-FilePrunus_fig4_331962891) (Pristupljeno:21.07.2021.)

Stablo divlje trešnje može narasti do visine od 20 metara. Kora navedene vrste je tamnosive boje i ljušti se u horizontalnom trakama i obično dugo ostaje glatka i sjajna. Dugi izbojci su nejednako obojeni i sjajni te posuti ovalno produženim lenticelama. Pupovi su pojedinačno raspoređeni duž izbojaka, dok se pri vrhu nalazi nekoliko pupova zajedno, a sam oblik pupa je jajast i zašiljenog vrha pokriven s više ljusaka. Razlikuju se lisni i cvjetni pupovi. Kratki izbojci su obično zbijeni i smežurani. (Idžojić 2005).

Divlja trešnja, u travnju za vrijeme listanja, razvija dvospolne, entomofilne cvjetove bijele boje. Samo cvjetanje počinje u starosti od 20 do 25 godina, a kod oplemenjenih vrsta znatno ranije, u starosti od 4 do 15 godina. Tijekom lipnja i srpnja dozrijevaju plodovi (trešnje), a to su glatke i mesnate koštunice crvene boje na dugačkim stapkama. (Idžojić 2013).



Slika 5. Stablo divlje trešnje u cvatu

(izvor: <https://caraghnurseries.ie/product/prunus-avium/>)



Slika 6. Pupovi divlje trešnje

(izvor: <https://www.pinterest.at/pin/301741243777665839/>)



Slika 7. Plodovi divlje trešnje

(izvor: <https://www.ehorticulture.com/tree-plants-seeds/fruit-tree-seeds/prunus-avium-detail.html>)

5. Materijal i metode

Prikupljanje izbojaka s nabubrenim pupovima u fazi dormancije, potrebnih za dobivanje eksplantata, obavljeno je prije početka vegetacije (ožujak) u sjemenskoj plantaži Polojec – Šartovac blizu Kutine. Prema definiciji klonska sjemenska plantaža je umjetni nasad genetski superiornih jedinki neke vrste drveća. Kako bi se smanjila mogućnost oprašivanja iz vanjskih izvora s genetski slabijim jedinkama, nasad je obično izoliran, a osniva se upravo radi što obilnije proizvodnje genetski superiornog sjemena potrebnog za proizvodnju sadnica. (Ballian i Kajba 2011). Klonske sjemenske plantaže se osnivaju cijepljenjem ili generativno, a potomci su najkvalitetnijih plus-stabala izabranih metodom selekcije. Kloniranjem (cijepljenjem) takvih genotipova fiksira se njihov genofond (Ballian i Kajba 2011).

Klonska plantaža divlje trešnje kraj Kutine je najveća sjemenska klonska plantaža divlje trešnje u Europi, koja na površini od 3,89 hektara uzgaja 27 klonova. Plantaža je osnovana 2001. godine radi proizvodnje kvalitetnog sjemena i sadnica divlje trešnje, upravo zbog pomanjkanja visokokvalitetnog drva divlje trešnje u našim šumama, što je rezultat nepravilnog periodiciteta plodonošenja i uroda sjemena (Šapina 2013).

Navedeni nasad osnovan je prikupljanjem materijala s plus stabala divlje trešnje iz različitih šumarija (Đulovac, Novska, Kloštar Podravski, Koprivnica, Lipovljani, Kutina, Požega i Garešnica). Plemke plus stabala su cijepljene na podloge sjemenjaka, a sam raspored cijepljenih biljaka u plantaži je nasumičan radi ravnomjernog oprašivanja. Svrha osnivanja klonske plantaže je omogućiti međusobno oprašivanje fenotipski najkvalitetnijih jedinki (plus-stabala) kako bi se proizveo kvalitetni sjemenski materijal (Šapina 2013). Pritom se polazi od pretpostavke da se jedinke pozitivnih fenotipskih karakteristika rezultat dobrog genotipa. Budući da je porijeklo roditeljskih jedinki poznato ono je garancija proizvodnje kvalitetnog sjemena (Šapina 2013 prema: Kajba i sur. 2007). Samo osnivanje klonskih sjemenskih plantaža, selekcioniranim jedinkama najkvalitetnijih fenotipskih svojstava, jedan je od postupaka proizvodnje genetski poboljšanih jedinki i pripada genetsko - biološkoj disciplini koja se naziva oplemenjivanje šumskog drveća. (Ballian i Kajba 2011)



Slika 8. Klonska sjemenska plantaža divlje trešnje kraj Kutine

5.1. Prikupljanje uzoraka

Za potrebe mikropropagacije, u proljeće 2021. godine su prikupljeni uzorci od 9 klonova, odnosno uzorkovane su grančice s nabubrenim pupovima u fazi dormancije. Pritom se radilo o sljedećim klonovima: klonu PŽ-16 porijeklom s područja šumarije Požega, klonovima 5R2-16, KC2-18, NB-1-10 i R1-14 s područja šumarije Koprivnica, klonu ĐU2-6 porijeklom s područja šumarije Đulovac, klonu 5KP-5-22 s područja šumarije Kloštar Podravski te klonovima L2-21 i L4-15 s područja šumarije Lipovljani. Sa svakog odabranog stabla (klona) uzeta su po četiri uzorka grančica: jedan uzorak (grančica) na dnu i jedan na vrhu krošnje sa sjeverne strane svijeta te također po jedan uzorak na vrhu i jedan uzorak na dnu krošnje s južne strane svijeta. Na taj način je prikupljeno ukupno 36 uzoraka grančica s nabubrenim pupovima koji su potom označeni i spremljeni u plastične vrećice, gdje su se do početka pokusa čuvali na temperaturi od 4 °C .



Slika 9.



Slika 10.

Slike 9. Uzimanje izbojaka s vrha krošnje, Slika 10. Uzimanje izbojaka s dna krošnje

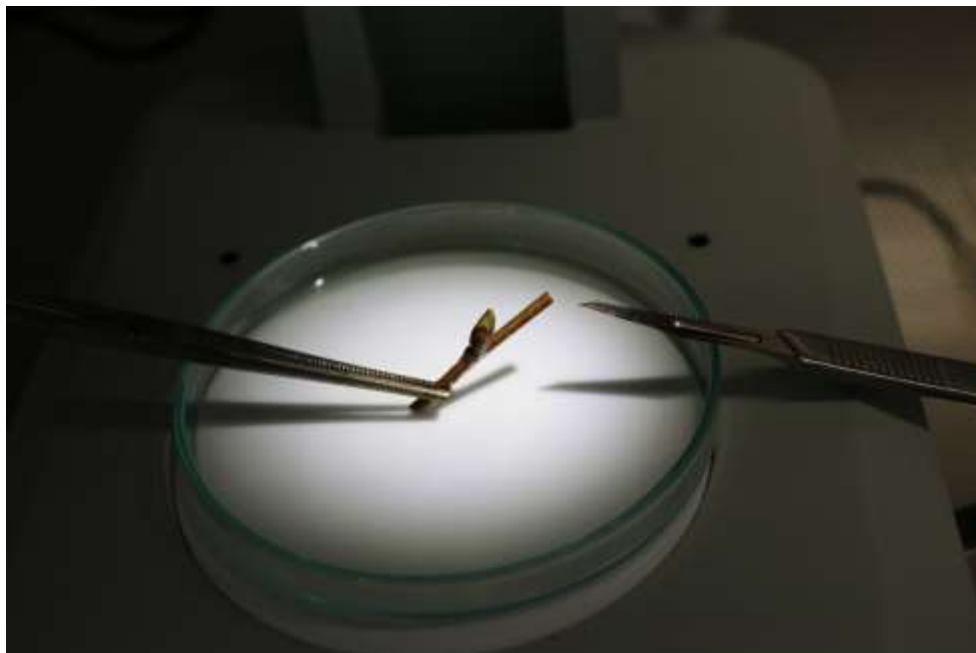
5.2 Uvođenje pupova u kulturu tkiva

Nastavak pokusa obavljen je u laboratoriju za kulturu tkiva, na Hrvatskom šumarskom institutu u Jastrebarskom, gdje je za potrebe istraživanja provedena mikropropagacija, metodom kulture meristema. Navedenom su metodom izolirani meristemi iz pupova s prikupljenih izbojaka divlje trešnje te su potom nasađeni na hranidbenu podlogu.

Prije samog uvođenja pupova u kulturu *in vitro* provedena je njihova površinska sterilizacija, kako bi se spriječila mogućnost kontaminacije hranidbene podloge mikroorganizmima. Za navedenu svrhu su grančice s pupovima rezane na segmente s po jednim pupom te su potom ispirani tekućom vodom i osušeni između dva papirnata ručnika. Potom su segmenti uronjeni u 70% alkohol na 10 sekundi i ponovno su osušeni papirnatim ručnicima. Nastavak sterilizacije obavljen je uranjanjem izrezanih segmenata u otopinu, načinjenu od 20 ml varikine (4-6% natrijevog

hipoklorita), 180 ml destilirane vode i nekoliko kapi Tweena, te njihovog miješanja na magnetnoj miješalici u trajanju od 20 minuta.

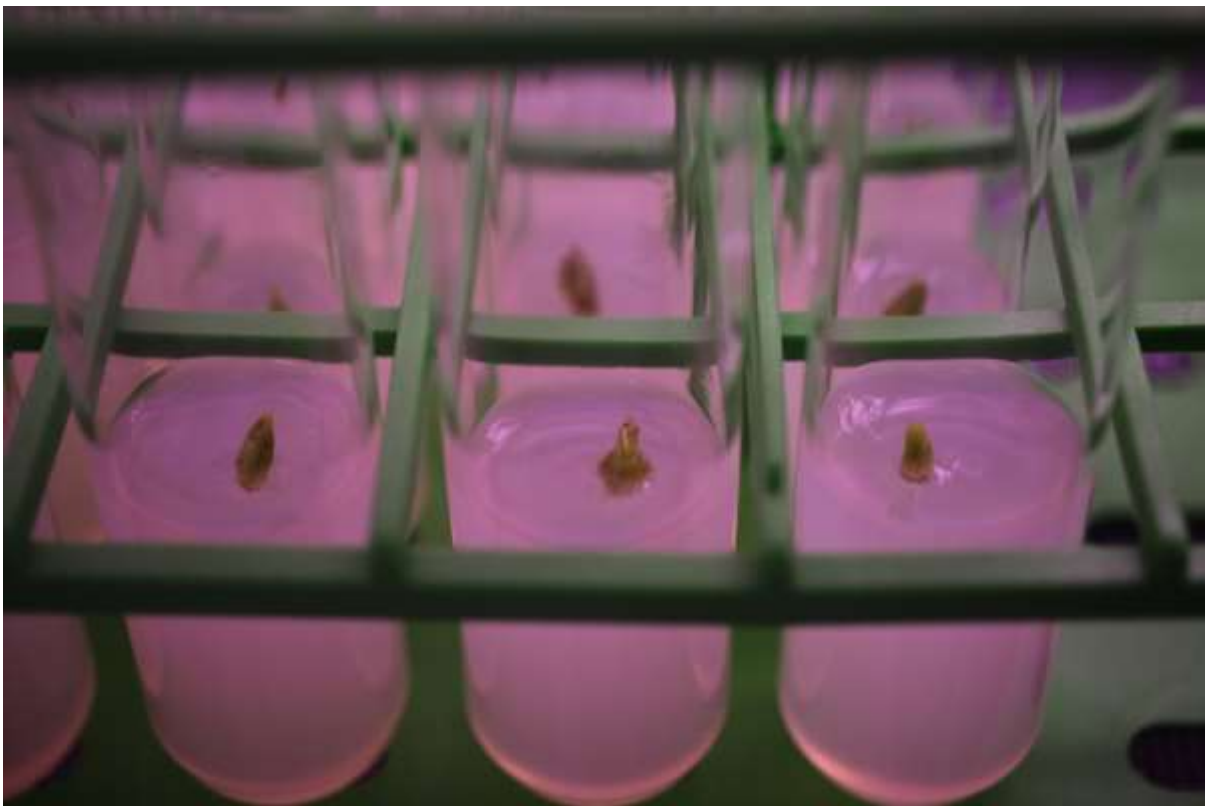
Samo uvođenje pupova u kulturu tkiva obavljeno je u laminarnim kabinetu s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka, kako bi se izbjegla mogućnost kontaminacije hranidbene podloge. U navedenim uvjetima je nastavljena površinska sterilizacija izrezanih segmenata, njihovim ispiranjem 1 minutu u 70 % alkoholu i ispiranjem 3 puta po 3 minute u steriliziranoj vodi, uporabom magnetne miješalice. Po završetku navedenog postupka pupovi su bili spremni za uvođenje u kulturu pa su sterilnom pincetom premješteni u sterilne pertijeve zdjelice.



Slika 11. Izrezani segment s pupom spreman na uklanjanje listića

Uporabom sterilnog pribora koji su činili pinceta i sterilni nož, pod stereomikroskopom je provedeno uklanjanje vanjskih listića s pupova. Nakon što su pupovi očišćeni od vanjskih listića jedan po jedan su nasađivani u epruvete, na unaprijed pripremljenu hranidbenu podlogu. Kako bi se spriječila kontaminacija epruvete su zatvorene sterilnim čepom i dodatno omotane prozirnom folijom. Označavanjem epruveta šifrom

klona, određena je pripadnost inokuliranih pupova pojedinom klonu. Budući da su za svaki klon prikupljena po 4 uzorka grančica s pupovima (grančice s pupovima, za svaki klon, su prikupljane na vrhu i na dnu krošnje sa sjeverne strane svijeta te isto tako i s južne strane svijeta) za svaki od 4 uzorka, pojedinog klona, u kulturu je uvedeno po 6 pupova. Što čini 24 pupa po pojedinom klonu, a ukupno 216 pupova. Po završetku zahvata mikropropagacije inokulirane kulture su smještene u klima komoru uz 16 satno osvjetljenje bijelom svjetlošću (fluorescentne cijevi, 40 W, 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na temperaturi 23 – 24 °C.



Slika 12. Pupovi divlje trešnje uvedeni u kulturu tkiva (Bogunović 2021)



Slika 13. Inokulirane kulture u klima komori (Bogunović 2021)

5.3. Sastav hranidbene podloge

Za uvođenje pupova u kulturu korištena je modificirana hranjiva podloga MS (Murashige i Skoog 1962) uz dodatak 30 g/L saharoze i 8 g/L agara. U hranjivu podlogu dodani su i biljni regulatori rasta: 1,0 mg/L 6-benzilaminopurina (BAP) i 0,1 mg/L 1-naftalenacetatne kiseline (NAA). Hranjiva podloga pripravljena je otapanjem svih sastojaka u destiliranoj vodi u Erlenmeyerovoj tikvici uz konstantno miješanje na magnetnoj miješalici. pH vrijednost hranjive podloge iznosila je 6,0. Pripremljena hranjiva podloga razlivena je u epruvete te je autklavirana 20 minuta na 121 °C .

Tablica 1. Sastav hranidbene podloge

Makroelementi	mg/L
KNO ₃	950,0
NH ₄ NO ₃	825,0
CaCl ₂ x 2H ₂ O	220,0
MgSO ₄ x H ₂ O	185,0
KH ₂ PO ₄	85,0
Mikroelementi	mg/L
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ x 4H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
CoCl ₄ · 6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
Vitamini	mg/L
Inozitol	100,0
Tiamin	1,0
Nikotinska kiselina	1,0
Glicin	2,0

5.4. Ocjenjivanje razvoja pupova

Inokulirane kulture svoj razvoj su nastavile u klima komori, a tijekom toga je provedeno praćenje njihovog razvoja kroz razdoblje od 40 dana. Pritom je praćen razvoj svakog uzoraka pojedinog klonu (24 uzorka po klonu). U svrhu praćenja napretka razvoja biljčica definirane su 4 faze razvoja inokuliranih kultura. Faza 0 označavala je potpuno

zatvorene pupove, faza 1 početak otvaranja listića inokuliranog pupa, faza 2 razvijene listiće i faza 3 potpuno ispunjene epruvete listićima, spremne za presađivanje na novu podlogu (Slika 11). Tijekom monitoringa zabilježene su i infekcije kultura gljivama, pa su one uklonjene radi sprječavanja kontaminacije ostalih uzoraka. Monitoring inokuliranih uzoraka proveden je u nekoliko navrata. Ujedno je za svaki datum monitoringa, u zato predviđene formulare evidentiran napredak u razvoju pojedinog uzorka, svakog klona, s oznakom faze razvoja u rasponu od 0 do 3. Pojava gljive u pojedinom uzorku također je evidentirana i zabilježena u formularu. Za varijable kojima je uspoređen razvoj i uspjeh svih uzoraka odabrano je svojstvo zapaženog stadija rasta biljčice na 40. dan od uvođenja (R40) i preživljenje.



Slika 14. Biljčice u fazama 1, 2 i 3

5.5. Statistička analiza

Deskriptivna analiza

Deskriptivna analiza podataka za svojstvo zapaženog stadija rasta biljčice na 40. dan od uvođenja (R40) i svojstvo preživljenja provedena je korištenjem MEANS procedure u SAS® software-u (SAS/STAT softver, besplatna verzija, SAS University Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Ova je analiza provedena s ciljem izračunavanja prosječnih vrijednosti analiziranih značajki, minimalnih i maksimalnih vrijednosti, te pripadajućih varijanci odnosno standardnih devijacija.

Analiza varijance

Za analizirano svojstvo zapaženog stadija rasta biljčice na 40. dan od uvođenja korištena je ordinalna skala (0 - 3) i ono nije bilo normalno distribuirano. Zbog toga je analiza varijance provedena uporabom neparametarskog Kruskal-Wallis rank sum testa u R software-u. Statistička značajnost razlika među populacijama utvrđena je usporedbom parova Wilcoxon-ovim rank sum testom, također u R software-u. Ispitivana su tri učinka – klon, strana svijeta (Sjever – Jug) i položaj u krošnji (Gore – Dolje).

Za svojstvo preživljenja korištene su vrijednosti 0 (nije preživjela) ili 1 (preživjela) i analiza varijance također je provedena neparametarskom metodom. Promatrana su ista tri učinka.

6. Rezultati

Analiza varijance

Neparametarska analiza varijance pokazala je da je za oba svojstva (R40 i preživljenje) statistički značajan bio samo učinak klona, dok učinci strane svijeta i položaja u krošnji za ni jedno od ovih svojstava nisu bili značajni.

Svojstvo zapaženog stadija rasta biljčice na 40. dan od uvođenja (R40)

Za svojstvo R40 klonovi su se međusobno signifikantno razlikovali, uz stupanj značajnosti $p < 0.001$ ($p = 7.886e-11$). Wilcoxonov rank sum test je pokazao da klonovi formiraju tri grupe od kojih samo klon KC2 pripada dvjema grupama, a klon R2 formira zasebnu grupu i signifikantno se razlikuje od svih ostalih klonova.

Tablica 2 – pripadnost klonova grupama po Wilcoxon-ovom rank sum testu

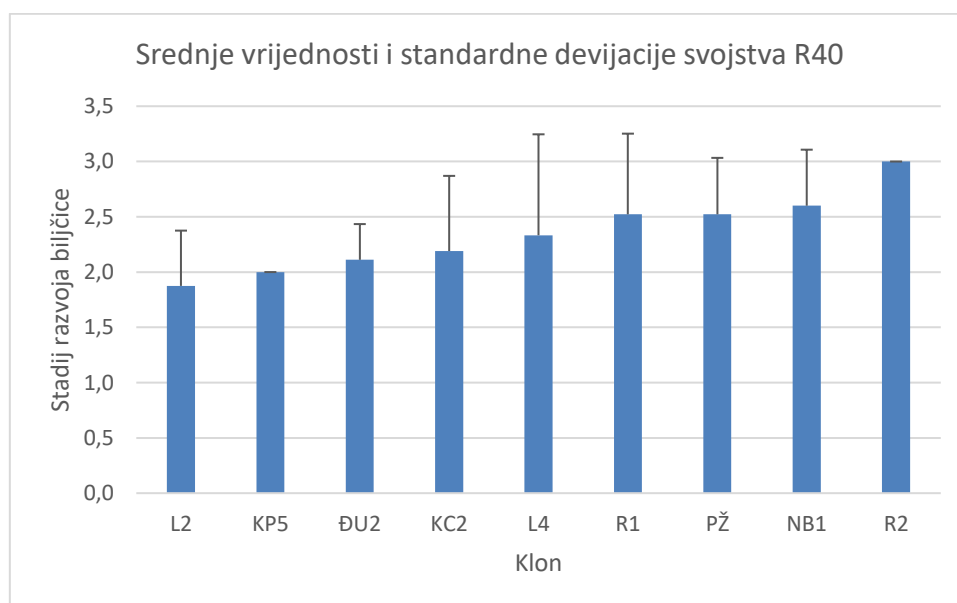
L2	A		
KP5	A		
ĐU2	A		
KC2	A	B	
L4		B	
R1		B	
PŽ		B	
NB1		B	
R2			C

Svojstvo preživljenja

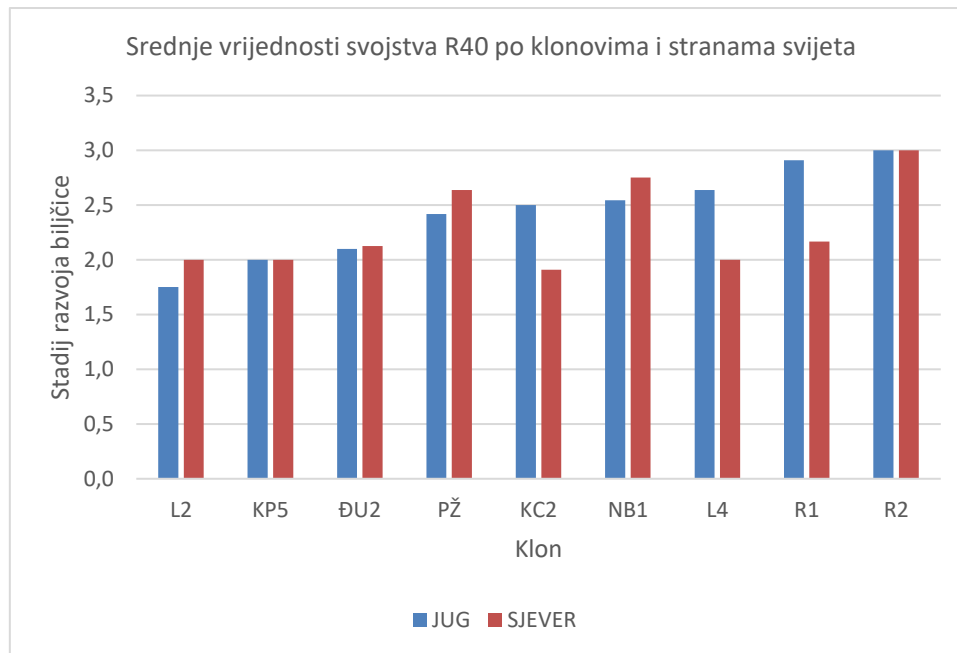
Za svojstvo preživljenja klonovi su se međusobno signifikantno razlikovali, uz stupanj značajnosti $p < 0.01$ ($p = 0.001071$). Wilcoxonov rank sum test je pokazao da značajne razlike proizlaze iz razlike tri klona sa najmanjim preživljenjem (KP5, NB1, L2) i tri klona sa najvećim preživljenjem (PŽ, R1, R2)

Tablica 3 – pripadnost klonova grupama po Wilcoxon-ovom rank sum testu

<i>KP5</i>	<i>A</i>	
<i>NB1</i>	<i>A</i>	
<i>L2</i>	<i>A</i>	
<i>ĐU2</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<i>KC2</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<i>L4</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<i>PŽ</i>		<i>B</i>
<i>R1</i>		<i>B</i>
<i>R2</i>		<i>B</i>

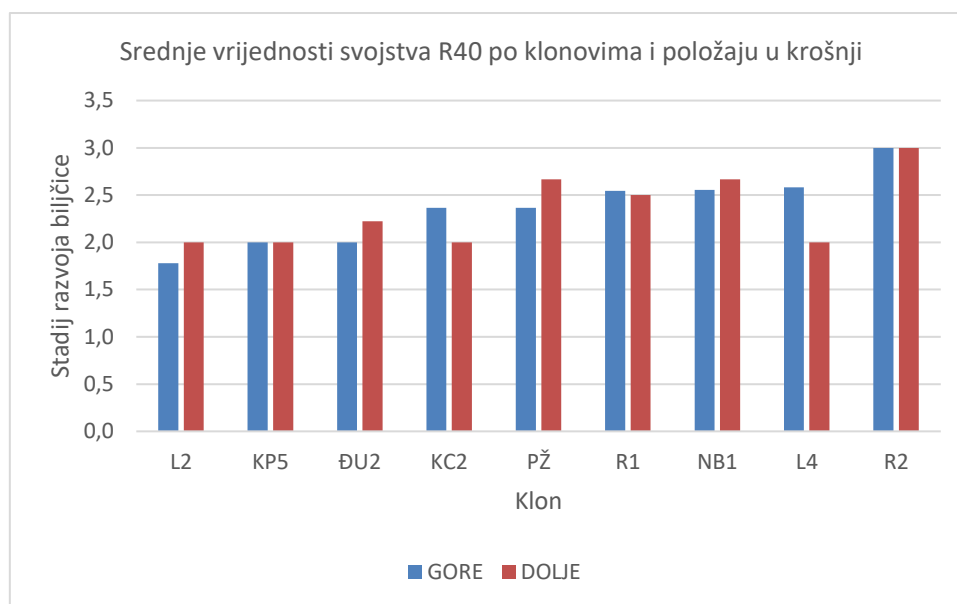


Grafikon 1 – Srednje vrijednosti i standardne devijacije svojstva rasta biljčica na 40. dan od uvođenja u kulturu tkiva po klonovima



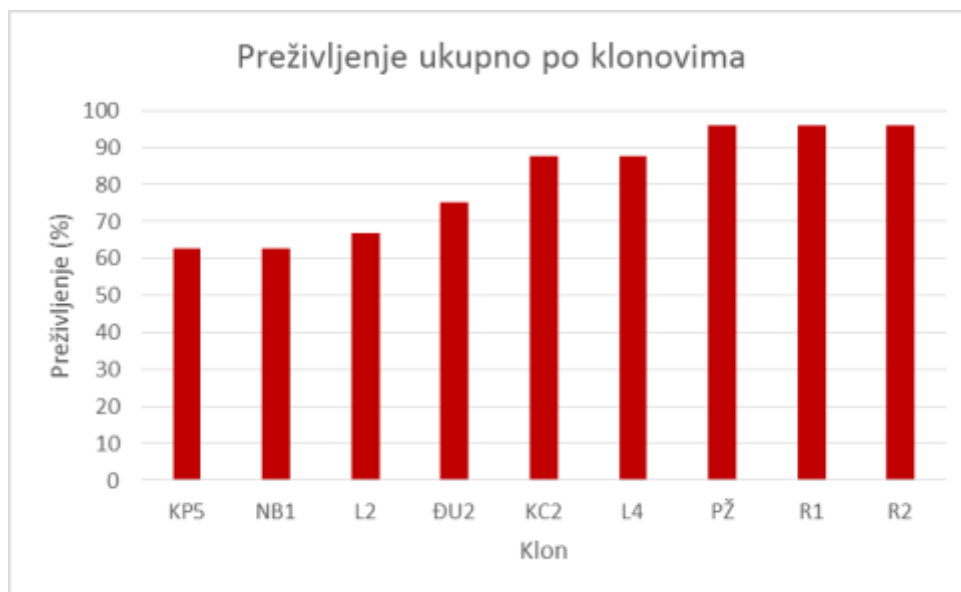
Grafikon 2 – Srednje vrijednosti svojstva rasta biljčica na 40. dan od uvođenja u kulturu tkiva po klonovima i stranama svijeta

Na grafikonu 2 prikazane su srednje vrijednosti rasta biljčica na 40. dan od uvođenja u kulturu tkiva po klonovima i stranama svijeta. Na navedenom prikazu je vidljivo da najbolje srednje vrijednosti rasta po stranama svijeta (sjever i jug) ima klon R2 s iznosom od 3.0, dok se najmanje uspješnim pokazao klon L2 čija srednja vrijednost za jug iznosi 1,8, a za sjever 2,0. Na grafikonu 2 je također vidljivo da 4 klona (L2, ĐU2, PŽ i NB1) imaju veću srednju vrijednost rasta na sjevernoj strani svijeta, 3 klona (KC2, L4 i R1) na južnoj strani svijeta, dok su srednje vrijednosti rasta po stranama svijeta za 2 klona (KP5 i R2) bile jednake za obje strane svijeta.



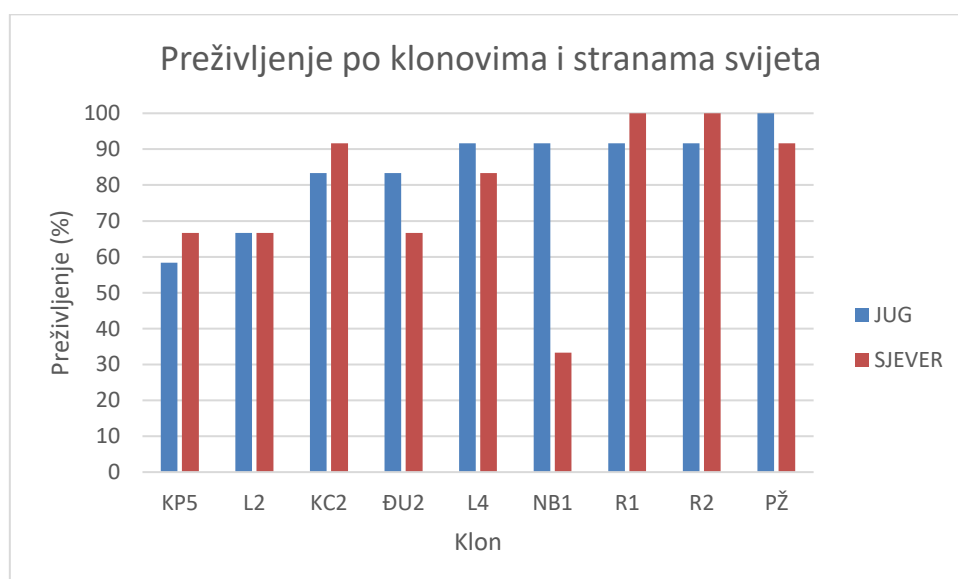
Grafikon 3 – Srednje vrijednosti svojstva rasta biljčica na 40. dan od uvođenja u kulturu tkiva po klonovima i položaju u krošnji

Na grafikonu 3 prikazane su srednje vrijednosti svojstva rasta biljčica na 40. dan od uvođenja u kulturu tkiva po klonovima i položaju u krošnji. Iz grafikona se može iščitati da klon R2 ima najbolju srednju vrijednost svojstva rasta biljčica po položaju u krošnji od svih klonova s iznosom od 3.0. Isto tako vidljivo je da klon R2 pokazuje jednaku uspješnost rasta biljčica u gornjem i donjem dijelu krošnje. Najslabiju srednju vrijednost rasta po položaju u krošnji ima klon L2 s iznosom od 1.8 za gornji položaj u krošnji i s iznosom od 2.0 za donji položaj u krošnji. Na grafikonu je također vidljivo da su se biljčice 4 klona (L2, ĐU2, PŽ i NB1) porijeklom iz donjeg dijela krošnje razvije bolje od onih porijeklom iz gornjeg dijela krošnje. Za tri klona (KC2, R1, L4) bolje srednje vrijednosti rasta pokazivale su biljčice iz gornjeg dijela krošnje, a biljčice preostala dva klona (KP5 i R2), porijeklom iz gornjeg i donjeg dijela krošnje jednako su se uspješno razvijale.



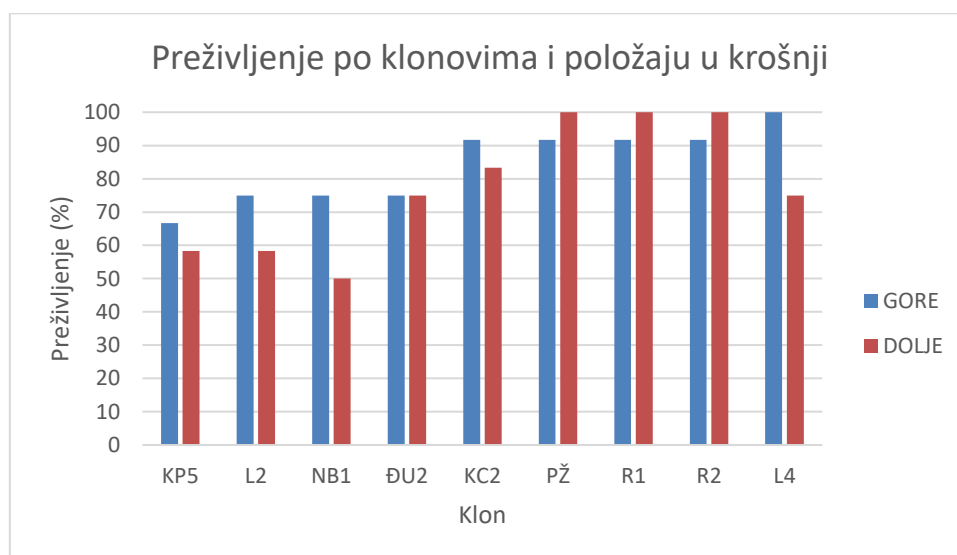
Grafikon 4 – Preživljenje biljčica po klonovima

Uzorci pojedinih klonova tijekom razvoja pokazali su simptome infekcija gljivama, zbog kojih nisu preživjeli. Na grafikonu 4 je vidljivo da su klonovi PŽ i R2 imali najbolji postotak preživljenja u iznosu većem od 90 %, dok je najviše infekcija gljivama zabilježeno na klonovima KP5 i NB, zbog čega je postotak njihovog preživljenja iznosio nešto više od 60 %.



Grafikon 5 – Preživljenje biljčica po klonovima i stranama svijeta

Na grafičkom prikazu 5. vidljivo je da su klonovi prijekom sa sjeverne i južne strane svijeta imali podjednako preživljenje. Na južnoj strani svijeta bolje preživljenje su pokazala 4 klona (ĐU2, L4, NB1 i PŽ). Na sjevernoj strani svijeta manje infekcija gljivama pokazali su klonovi (KP2, KC2, R1 i R2) dok je klon L2 imao jednak postotak preživljenja na sjevernoj i južnoj strani svijeta (više od 60%). Najbolji postotak preživljenja po stranama svijeta pokazali su klonovi R1 i R2. Također je vidljivo da je klon NB1 imamo najmanji postotak preživljenja na sjevernoj strani svijeta (nešto više od 30%).



Grafikon 6 – Preživljenje biljčica po klonovima i položaju u krošnji

S obzirom na preživljenje biljčica po klonovima i položaju u krošnji, na grafikonu 6 je vidljivo da su biljčice klonova porijeklom iz gornjeg položaja u krošnji bile manje izložene infekcijama gljivama, odnosno imale su bolji stupanj preživljenja (klonovi KP2, L2, NB1, KC2 i L4) od onih porijeklom iz donjeg dijela krošnje. Ni jedna infekcija gljivama nije zabilježena kod klonova PŽ, R1 i R2 porijeklom iz donjeg položaja u krošnji. Isto tako postotak preživljenja navedenih klonova porijeklom iz donjeg dijela

krošnje bio je veći od 90 %. Najviše infekcija gljivama zabilježeno je kod klona NB1 i to kod biljčica porijeklom iz donjeg položaja u krošnji.

7. Rasprava

Rezultati neparametarske analize varijance pokazali su da učinci strane svijeta i položaja u krošnji ni za jedno od svojstava (svojstvo zapaženog stadija rasta biljčice na 40. dan od uvođenja (R40) i preživljenje) nisu bili statistički značajni. Statistički značajnim se pokazao samo učinak klona. Iako istraživanja i iskustvo pokazuju da je vegetativni biljni materijal uzet s dna krošnje bolji za zakorjenjivanje ili mikropropagaciju jer se smatra fiziološki mlađim od materijala uzetog s vrha krošnje, rezultati istraživanja ipak nisu pokazali statistički značajnu razliku u uspješnosti razvoja biljčica u kulturi tkiva s obzirom na poziciju u krošnji (gore - dolje).

U sjemenskoj plantaži u Kutini stabla (klonovi) divlje trešnje nisu nastala iz sjemena, već se radio o cijepovima. Sama plantaža je osnovana pomoću reznica uzetih s plus stabala divlje trešnje. Kako bi se izbjegli neželjeni efekti poput kasnije cvatnje i plodonošenja, reznice plus stabala su uzimane u fiziološki starijem dijelu krošnje, odnosno u njezinu vrhu. Na taj su način metodom cijepjenja u startu dobivene fiziološki starije biljke što može biti razlog drugačijih rezultata od onih postavljenih hipotezom.

Rezultati istraživanja su pokazali statistički značajne razlike u uspješnosti mikropropagacije između različitih klonova (genotipova) što je bilo očekivano, upravo zbog genetičke raznolikosti među klonovima te posljedično razlika u optimalnim uvjetima za njihov rast. Slične rezultate, u kojima je na uspješnost mikropropagacije utjecala genetska konstitucija, su pokazala mnoga istraživanja. Među njima je istraživanje kojim se proučavao učinak genotipa na mikropropagaciju vrste *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight & Arn. U navedenom radu provedena je mikropropagacija nodalnih eksplantata uzetih s 3 različita klona vrste arjuna. Budući da su klonovi pokazali različitu uspješnost razvoja kultura smatra se da različiti genotipovi zahtijevaju različite doze regulatora rasta za svoj optimalni razvoj (Choudhary i sur. 2020).

Prema istraživanju Yegizbayeve i sur. (2021), o uspješnosti mikropropagacije četiri sorte oraha (*Juglans regia* L.), ustanovljeno je da uz genotip i hranidbenu podlogu, na uspješnost razvoja inokuliranih kultura utječe i godišnje doba u kojem su prikupljeni uzorci za dobivanje eksplantata te međudjelovanje više različitih čimbenika.

U istraživanju utjecaja hranidbene podloge, duljine eksplantata i genotipa na mikropropagaciju vrste *Pinus teada* L., utvrđeno je da uspješno zakorjenjivanje i formiranje izdanaka navedene vrste ovisi upravo o genotipu (César i sur. 2015).

Kako bi se utvrdila adekvatna metoda za rutinsko provođenje mikropropagacije divlje trešnje provedeno je istraživanje nad 24 klona iz klonske sjemenske plantaže u Kutini. Cilj rada bio je utvrditi jedinstveni sastav hranidbene podloge i biljnih hormona za *in vitro* proizvodnju divlje trešnje (Tančeva Crmarić i Kajba 2016). U navedenom su radu uočene razlike u obrascu ponašanja pojedinih klonova ovisno o zemljopisnom porijeklu. Utvrđeno je da sastav hranidbene podloge ovisi o genotipu kao i aklimatizacija biljaka divlje trešnje čije je preživljenje ovisno o klonskoj varijabilnosti. Kao problem uvođenja divlje trešnje u kulturu tkiva navode i mogućnost zaraženosti prikupljenog biljnog materijala za mikropropagaciju mikroorganizmima, što je bio slučaj i u ovom istraživanju. Chikh (prema Tančeca Crmarić i Kajba 2016) navodi kako uspješnost mikropropagacije uspostavom *in vitro* kulture ovisi o sastavu minerala i hormona hranidbene podloge, kao i o dobi početnih eksplantata. S obzirom na navedeno za mikropropagaciju se koriste različite formulacije sastava hranidbenog medija, koje ovisi o kultivaru i genotipu.

8. Zaključak

Iako istraživanja pokazuju kako je biljni materijal uzet s dna krošnje pogodniji za vegetativno razmnožavanje, od biljnog materijala porijeklom iz gornjeg dijela krošnje, rezultati ovog istraživanja nisu pokazali statistički značajnu razliku u uspješnosti razvoja inokuliranih kultura divlje trešnje s obzirom na poziciju biljnog materijala u krošnji. Jedan od mogućih razloga dobivenih rezultata je osnivanje klonske plantaže divlje trešnje biljkama, koje nisu nastale generativno (iz sjemena), već su dobivene cijepljenjem. Radi izbjegavanja negativnog efekta poput kasnijeg cvjetanja i plodonošenja, plemke plus stabala su uzimane u vrhu krošnje, koji se smatra fiziološki starijim, te su na taj način u samom početku dobivene starije biljke.

Statistički značajne razlike zabilježene su među različitim klonovima što je bilo očekivano upravo zbog njihove genetske varijabilnosti te samim time njihove različite sposobnosti regeneracije. Genotipovi istraživanih klonova porijeklom su iz različitih geografskih područja te posjeduju međusobno različitu genetsku konstituciju. Budući da se genetski razlikuju imaju različite zahtjeve prema sastavu hranidbene podloge te njezinog mineralnog sastava i biljnih hormona, kao i prema uvjetima rasta. Kako su klonovi divlje trešnje uzgajani na hranidbenoj podlozi istog mineralnog i hormonskog sastava, a razlikuju se prema genetskoj konstituciji i uvjetima rasta, pojedinim je klonovima hranidbeni medij bio pogodniji za rast i preživljenje od ostalih klonova.

9. Literatura

Cézar, T.,M., Higa, A.,R., Koehler, H.S, Ribas, L.,L.,F 2015: Influence of culture medium, explant length and genotype on micropropagation of *Pinus taeda* L., Ciência Florestal, Santa Maria, 13, 20 str.

Choudhary , M., Gehlot, A., Arya, S., Arya, I.,D, 2020: Effect of Genotypes on Micropropagation of Terminalia arjuna An Important Medicinal Tree, Environ. Sci. Proc.3. str

Franjić, J., Škvorc, Ž., 2010: Šumsko drveće i grmlje Hrvatske, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, 270.str

Franjić, J., Škvorc, Ž., Trinajstić, I., 2008: Anatomija bilja, Interna skripta, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, 36 -37.str

Idžojić, M. 2004: Listopadno drveće i grmlje u zimskom razdoblju, Sveučilište u Zagrebu Šumarski fakultet, Zagreb,163. Str

Idžojić, M., 2013: Dendrologija, cvijet, češer, plod, sjeme, Sveučilište u Zagrebu Šumarski fakultet, Zagreb, 446. str.

J.S. Rathore, Vinod Rathore, N.S. Shekhawat, R.P. Singh*, G. Liler, Mahendra Phulwaria and H.R. Dagla, 2005: Micropropagation of Woody Plants, Biotechnology Unit, Department of Botany, JNV University, Jodhpur 342 001, India, str. 3

Jelaska, S., 1994: Kultura biljnih stanica i tkiva, Školska knjiga, Zagreb, 5.str, 42 - 43 str., 215- 219 str., 88 -91. str.

Kajba, D., 2014: Klonsko šumarstvo-interna skripta, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1-2 str.

Kajba, D., Ballian, D., 2011: Oplemenjivanje šumskog drveća i očuvanje njegove genetske raznolikosti, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šumarski fakultet Sveučilišta u Sarajevu, Sarajevo-Zagreb,7, 9, 15 str., 168 -170 str.

Klaehn, F., U., 1962: The relation of vegetative propagation to topophysis, cyclophysis and periphysis in forest trees, Tree Improvement and Genetics Northeastern Forest Tree Improvement Conference 1962, 43. str

Kloniranje. (2018, siječnja 12). 'Wikipedija, Slobodna enciklopedija. Dostupljeno 14:50, srpnja 19, 2021 iz//hr.wikipedia.org/w/index.php?title=Kloniranje&oldid=5012680

Marjanović, D., Međedović, S., Čaušević, A., Hadžiselimović, R., 2000: Mikropropagacija divlje trešnje (*Prunus avium*) u kulturi in vitro, Works of the Faculty of Forestry, Sveučilište u Sarajevu, 36. str.

Minghe, L., Faxin, H., 2000: Performance of Chinese – fir (*Chunninghamia lanceolata* (Lamb.)(Hook)) Plantlets from Upper – crown and Basal Modified by Grafting and Development as Buried Ramets before Explant Harvest, str. 42. – 43.

Paradžiković, N., 2014: Principi florikulture, Predavanja, Sveučilišni preddiplomski studij na Sveučilištu J.J.Strossmayer u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek, 21. str

Petrović, A., 2019: Utjecaj metatopolina na mikropropagaciju i zakorjenjivanje jabuke sorte gala, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb, 15. Str

Sanchez, M., C., Vieitez, A., M., 1990: In vitro morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut, Plant Physiology, CSIC, Apartado 122,15080 Santiago de Compostela, Spain, str: 59

Šapina, V., 2013: Generativna aktivnost divlje trešnje (*Prunus avium* L.) u klonskoj sjemenskoj plantaži, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb, 18. Str

Škvorc, Ž., Sever, K., Franjić, J., 2013: Fiziologija šumskog drveća, interna skriptu, Sveučilište u Zagrebu Šumarski fakultet, Zagreb, 85- 86 str.

Tančeva Crmarić, O., Kajba, D., 2016: Micripropagation of wild cerry (*Prunus avium*) from clonal seed orchard, Šumarski list, 5-6, 273 – 282 str.

Yegizbayeva, T.K.; García-García, S.; Yausheva, T.V.; Kairova, M.; Apushev, A.K.; Oleichenko, S.N.; Licea-Moreno, R.J, 2021: Unraveling Factors Affecting Micropropagation of Four PersianWalnut Varieties. Agronomy 1,15,16 str. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071417>

Yildiz, M., 2012: The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration, Open access peer ' rewied chapter, (izvor: <https://www.intechopen.com/chapters/40187>, 13.08. 2021.)

Zec, M., 2017: Mikropropagacija kupine sorte „Reuben“, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 9 str.

Agroklub: Divlja trešnja : Cijenjeno drvo za proizvodnju sadnog materijala i očuvanje bioraznolikosti <https://www.agroklub.com/sumarstvo/divlja-tresnja-cijenjeno-drvo-za-proizvodnju-sadnog-materijala-i-ocuvanje-bioraznolikosti/59276/>,
(Pristupljeno:21.07.2021.)

Agroklub: Znete li da se u Hrvatskoj nalazi najveća klonska plantaža divljih trešanja u Europi? <https://www.agroklub.com/sumarstvo/znete-li-da-se-u-hrvatskoj-nalazi-najveca-klonska-plantaza-divljih-tresanja-u-europi/43939/> (Pristupljeno : 01.08.2021.)

Regionalni centar za biotehnoška istraživanja i razvoj Brodsko posavske županije, Odjel za biljnu proizvodnju,<http://www.biotech.hr/djelatnosti/proizvodnja/> (Pristupljeno: 01.08.2021.)

Wikipedija, slobodna enciklopedija: - suradnici, "Stanična potentnost, [Stanična potentnost – Wikipedija \(wikipedia.org\)](https://hr.wikipedia.org/w/index.php?title=Stani%C4%8Dna_potentnost&oldid=6008367)" Wikipedija, Slobodna enciklopedija, //hr.wikipedia.org/w/index.php?title=Stani%C4%8Dna_potentnost&oldid=6008367 (Pristupljeno kolovoza 20, 2021).

Wikipedija, Slobodna enciklopedija: Genetička varijabilnost https://bs.wikipedia.org/wiki/Geneti%C4%8Dka_varijabilnost (Pristupljeno:05.09.2021.)

Wikipedija, Slobodna enciklopedija: Genotip, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Genotip> (Pristupljeno: 05.09. 2021.)

Wikipedija, Slobodna enciklopedija: *In vitro*, https://hr.wikipedia.org/w/index.php?title=In_vitro&oldid=5439688 (Pristupljeno 20.07.2021.)

Štetnici Hr, Trešnja (Prunus avium), [https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/tresnja_\(prunus_avium\)](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/tresnja_(prunus_avium)) (Pristupljeno: 20.07.2021)