

Razmnožavanje crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* Michx.) u uvjetima in vitro

Mahečić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:879857>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveu ilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matemati ki fakultet
Biološki odsjek

Ivana Mahe i

**Razmnožavanje crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* Michx.)
u uvjetima in vitro**

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Diplomski rad izrađen je u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Pevalek-Kozlina i pomoćnim vodstvom dr. sc. Marije Babić, te je predan na ocjenu Biološkom odsjeku radi stjecanja zvanja prof. biologije i kemije.

Iako je izrada diplomskog rada kraj jednog važnog razdoblja svakog studenta, ona je svakako i novi, sasvim druga iji po etak. Zapo eti nešto novo i kretati u nepoznato nije jednostavno, barem ne bez pomo i i savjeta upu enih i iskusnih osoba. Stoga želim zahvaliti svima koji su mi barem i malo pomogli prilikom provedbe istraživanja i izrade ovoga rada, ali i svima onima koji su mi tijekom cijelog studija bili neizostavna podrška.

Kada je mentor stru an, organiziran i uvijek pozitivan, onda je i studentu lakše izvršavati zadatke. Upravo takovog mentora imala sam u osobi prof. dr. Branke Pevalek-Kozlina, te joj na tome najljepše zahvaljujem.

Puno dugujem pomo noj voditeljici dr. sc. Mariji Babi bez ije bi pomo i i nadasve strpljenja izrada ovoga rada bila nemogu a. Hvala Vam na svim prakti nim znanjima, uputama i savjetima, ali i na uvijek vedrom i veselom raspoloženju.

Hvala svim asistentima i tehni arima na Zavodu što ste me odmah prihvatili kao dio ekipe, te sam se uvijek osje ala ugodno. Bilo je zadovoljstvo raditi s vama.

Kona no želim zahvaliti svim kolegicama i kolegama, te profesoricama i profesorima na pomo i tijekom studija. Naravno, ogromno hvala i roditeljima koji su „trpili sve moje mušice“ tijekom studiranja i spremno mi opraštali.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ivana Mahe i

Botanički zavod Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu, Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Crnoplodna aronija (*Aronia melanocarpa* Michx.) listopadni je grm iz porodice ruža (*Rosaceae*), čiji plodovi obiluju polifenolima i antocijanima.

U sklopu diplomskog rada razrađena je metoda uvođenja vrste *Aronia melanocarpa* u kulturu *in vitro*, kao i metoda brze multiplikacije izdanaka. Kao početni eksplantati korišteni su odsjeci granica aronije dugački jedan centimetar koji su sadržavali po jedan botanički pup. Kontaminacija inokuliranih izdanaka bila je zanemariva (nakon 6 tjedana 91% izdanaka ostalo je sterilno). Umnažanje je provedeno na MS podlozi s dodatkom različitih koncentracija regulatora rasta 6-benzilaminopurina (BA), giberelinske kiseline (GA_3), te indol-3-maslačne kiseline (IBA). Najbolji rezultati (12,6 izdanaka po eksplantatu) postignuti su na MS podlozi s dodatkom $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ BA, $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ GA_3 , te $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ IBA.

(37 stranica, 5 tablica, 18 slika, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6, Zagreb.

Cljučne riječi: *Aronia melanocarpa*, mikroporpagacija, MS podloga, IBA, GA_3 , BA

Voditelj: Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina

Pomoćni voditelj: Dr. sc. Marija Babi

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina
Prof. dr. sc. Dubravka Matković - alogovi (KO)
Doc. dr. sc. Biserka Prugovečki (KO)
Prof. dr. sc. Ines Radanović

Zamjena: Doc. dr. sc. Željka Vidaković -Cifrek

Rad prihvaćen: 14. 10. 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

Ivana Mahe i

Department of Botany, Faculty of Science
University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Michx.) is a deciduous bush-like plant which belongs to the Rosaceae family. Their fruits have a high concentration of polyphenols and anthocyanins.

The possibility of *in vitro* propagation of *Aronia melanocarpa* has been investigated. The initial explants were 1 cm long chokeberry shoot segments containing one lateral bud. After the surface sterilization, the explants were inoculated to MS medium. The contamination of incubated shoots was negligible (after 6 weeks 91% of shoots remained sterile). Multiplication was developed on MS medium, supplemented with different concentrations of 6-benzylaminopurine (BA), gibberellic acid (GA₃) and indole-3-butyric acid (IBA). The highest multiplication rates per explant (12.6) were achieved on MS medium with the addition of 1.0 mg dm⁻³ BA, 0.5 mg dm⁻³ GA₃ and 0.1 mg dm⁻³ IBA.

(37 pages, 5 tables, 18 pictures, 47 references, original: in Croatian)

The graduation thesis is stored in Central Biological Library, Faculty of Science, University of Zagreb.

Keywords: *Aronia melanocarpa*, micropropagation, MS medium, IBA, GA₃, BA

Supervisor: Dr. Branka Pevalek-Kozlina, full professor

Supervisor assistant: Dr. Marija Babi

Reviewers: Dr. Branka Pevalek-Kozlina, full professor
Dr. Dubravka Matkovi - alogovi (KO), full professor
Dr. Biserka Prugove ki (KO), assistant professor
Dr. Ines Radanovi , associated professor

Replacement: Dr. Željka Vidakovi -Cifrek, assistant professor

Thesis accepted: 10/14/2009

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ARONIJA - IDEALNA BILJKA.....	2
1.2. RAZMNOŽAVANJE BILJAKA U UVJETIMA <i>in vitro</i>	5
1.2.1. STERILIZACIJA BILJNOG MATERIJALA.....	5
1.2.1.1. <i>Izosan-G, granulat za op u dezinfekciju i sanitaciju vode</i>	6
1.2.1.2. <i>Vodikov peroksid kao dezinfekcijsko sredstvo</i>	7
1.2.1.3. <i>Živin(II) klorid kao dezinfekcijsko sredstvo</i>	7
1.2.2. RAZMNOŽAVANJE BILJAKA U UVJETIMA <i>in vitro</i>	8
1.2.2.1. <i>Inokulacija i supkultiviranje</i>	8
1.2.2.2. <i>Kultura aksilarnih (bo nih) pupova</i>	8
1.3. BILJNI REGULATORI RASTA.....	10
1.3.1. CITOKININI.....	10
1.3.2. GIBERELINI.....	11
1.3.3. AUKSINI.....	12
1.4. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA VRSTE <i>Aronia melanocarpa Michx.</i>	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	15
3. MATERIJAL I METODE.....	17
3.1. BILJNI MATERIJAL.....	18
3.2. METODE.....	18
3.2.1. STERILIZACIJA BO NIH PUPOVA.....	18
3.2.2. MULTIPLIKACIJA IZDANAKA U KULTURI.....	19
3.2.2.1. <i>Hranjive podloge</i>	19
3.2.2.2. <i>Sterilizacija pribora i podloga</i>	20
3.2.3. VANJSKI UVJETI KULTURE.....	20
3.3. STATISTI KA OBRADA PODATAKA.....	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. STERILIZACIJA EKSPLANTATA VRSTE <i>Aronia melanocarpa Michx.</i>	22
4.2. UMNAŽANJE IZDANAKA VRSTE <i>Aronia melanocarpa Michx.</i>	22
4.2.1. PRVA SUPKULTURA.....	22
4.2.2. DRUGA SUPKULTURA.....	23
4.2.3. TRE A SUPKULTURA.....	25
4.2.4. PROSJE NA STOPA UMNAŽANJA KROZ TRI SUPKULTURE.....	27

5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJU AK.....	32
7. LITERATURA.....	34

I. UVOD

1.1. ARONIJA – IDEALNA BILJKA

Do nedavno prili no nepoznata biljka, aronija je danas prozvana vo em budu nosti. Ve ina napisa o ovoj biljci navodi kako je ona idealno rješenje za vrt, vo njak ili plantažni uzgoj jer je nezahtjevna, uspijeva na svim vrstama tala, a još je k tome dekorativna i daje vrlo hranjive plodove.

Crnoplodna aronija predstavlja relativno novu vo nu vrstu koja se u Sjevernoj Americi po ela uzgajati tek prije pedesetak godina. U po etku se uzgajala isklju ivo kao ukrasna biljka, no nakon boljeg upoznavanja ljekovitih vrijednosti njezinih tamnih plodova uzgoj je postao intenzivniji.

Aroniju (*Aronia melanocarpa*) uvrštavamo u skupinu bobi astog (jagodi astog) vo a. Njezina domovina je Sjeverna Amerika, gdje su je dobro poznavali tamošnji Indijanci. Zanimljivo je da su ve oni koristili njezine plodove i bili svjesni njezine ljekovitosti i hranjivosti. Tamne plodove su sušili i zimi radili poga e koje su bile dobar izvor hranjivih tvari i energije. Tako er su kuhali aj iz njene kore i liš a, te njime vidali rane ili ga pak pili za ublažavanje probavnih smetnji.

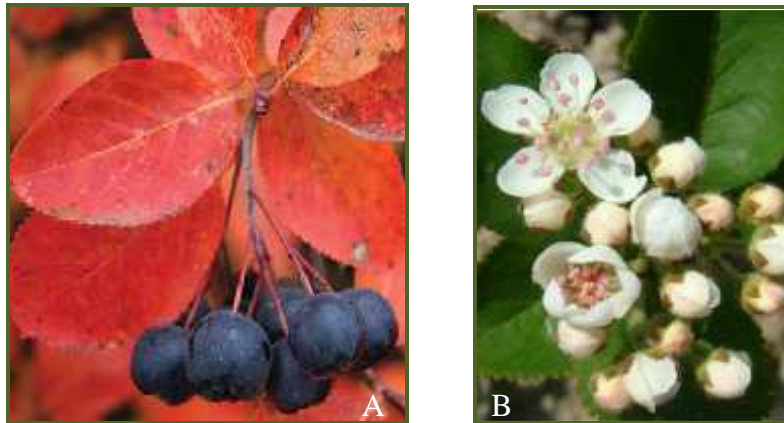
Ne zna se to no kada je crnoplodna aronija dospijela u Europu, ali budu i da je prili no prilagodljiva, danas se može na i od krajnjeg sjevera do Mediterana. Prve plantaže u Europi podižu se u Ukrajni, eškoj, Njema koj i Skandinaviji.

Crnoplodna aronija je biljka iz porodice ruža koja izraste u drvenasti grm (slika 1 A), a pravilnom i pravodobnom rezidbom može se oblikovati i u manje drvo (slika 1 B). Listopadni grm u prosjeku naraste do visine od 1,5 do 2 metra, no neki primjerci narastu i do visine od tri metra (www.greengarden.com; www.aronija.com).



Slika 1. Aronija kao grm (A) i kao niže stablo (B).

Aronija ima jajolike tamnozeleno-kožaste listove koji u jesen poprimaju žarko crvenu boju (slika 2 A). Ipak, na ovoj biljci, najupe atljiviji su nježno ružiasti cvjetovi i ona raskoš dolazi do izražaja tijekom mjeseca svibnja, kad aronija i cvate (slika 2 B). Cvjetovi tvore cvatove u obješenim grozdovima i traju prilično kratko, svega pet do šest dana. Plodovi također prilično brzo dozriju, za devedesetak dana. Koncem kolovoza su crvene boje, a u rujnu već imaju karakterističnu tamnoljubičastu (crnu) boju. Plodovi su u grozdovima od deset bobica koje su iznutra žarko crvene boje. Aronija je samooplodna biljka i odlikuje se stabilnim i redovitim prinosima.



Slika 2. Granica aronije u jesen s karakterističnim tamnim plodovima i žarko crvenim listovima (A); prekrasni cvjetovi koji se otvaraju u svibnju, također se vide proljetni, tamnozeleni listovi (B).

Upotreba plodova ove vrste je višestruka (tablica 1). Plodovi vrste *Aronia melanocarpa* prava su vitaminska bomba, a osim vitamina sadrže i brojne druge, za ljude, važne tvari. Kad se spominje ova voćka najčešće se piše o bogatoj vrijednosti vitamina, minerala, aromatičnih i biološki aktivnih tvari koje posjeduju. U plodu aronije su osim brojnih vitamina (A, C, P, iz skupine B: B9, B6, B2, te vitamin E i betakaroteni) prisutni i kalij, kalcij, željezo, mangan, molibden, jod i fosfor. Sok, odnosno čaj pripremljen iz aronije preporuča se svima koji imaju poteškoće s krvožilnim sustavom i krvnim tlakom. Posebno se preporuča kod upale bubrega, bira na želucu, šećerne bolesti, migrene, unutarnjih krvarenja i slabokrvnosti. Tvari sadržane u plodu aronije odstranjuju teške metale iz tijela, te se zato preporučaju oboljelima od raka i ljudima koji su bili podvrgnuti teškoj operaciji ili su preboljeli neku bolest. Zreli plodovi aronije sadrže također veliku količinu biofenola, tanina, flavonoida i antocijana. Od antocijana potječe tamna boja zrelih plodova. Neki antocijani čak sadrže tvari koje, kao i flavonoidi, štite stanice tijela od oštećenja i kancerogene degeneracije. Zreli plodovi aronije sadrže i različite biofenole koji dezinficiraju, pospješuju zacjeljivanje rana,

odstranjuju otrovne tvari iz tijela, smanjuju upale i previsok krvni tlak, poboljšavaju elastičnost krvnih žila te sprečavaju njihovo začepljenje. Zreli plodovi sadrže i veliku količinu karotena, koji štiti stanice od oštećenja, a kožu od opasnih opekotina sunca.

Zanimljivo je da su plodovi aronije masovno korišteni nakon katastrofe u Černobilu. Naime, brojni vojnici su tada morali lopatama ručno skupljati, zatrpavati i sanirati oslobođeni radioaktivni otpad pri čemu su bili izloženi velikoj radijaciji. Kako bi ublažili zdravstvene tegobe ozračenih osoba, liječnici su koristili plodove aronije. Ruskim liječnicima aronija je bila dobro poznata već sredinom tih 80-tih godina, a u gradu Bijukskoj je 1966. godine izgrađena tvornica u kojoj su se iz plodova aronije proizvodile vitaminske tablete (www.vinogradarstvo.com).

Na kraju ovog kratkog pregleda, valja spomenuti da osim crnoplodne postoji još i crvenoplodna aronija (*A. arbutifolia* L.). Neki znanstvenici ove dvije vrste tretiraju jedinstveno i smatraju da se ne mogu razlikovati od hibrida (*A. prunifolia* Marshall) nastalog meću usobnim križanjem (www.borovnicaunas.hr).

Tablica 1. Plodovi aronije iznimno su ljekoviti, te se mogu višestruko primjeniti u prevenciji i liječenju raznih bolesti.

DIO TIJELA	DJELOVANJE
GLAVA	poboljšava cirkulaciju krvi, te pomaže kod glavobolje i migrene
JETRA, GUŠTERA, ŠTITNJA	pospješuje rad te poboljšava i regulira izlučivanje hormona endokrinih žlijezda, pomaže kod bolesti štitnjače i gušavosti
KRV I KRVNE ŽILE	isti krv, pospješuje cirkulaciju, smanjuje krvni tlak i razinu šećera u krvi, te pomaže kod ateroskleroze, upale vena i proširenih vena
ŽELUDAC	smiruje grčeve i bolove u želucu kao i upalu sluznice želuca, te pomaže kod iritacija na želucu i želudane nerve
CRIJEVA	ublažavaju i djeluje na grčeve i bolove u crijevima te smiruje upalu sluznice crijeva i zaustavlja proljeve
JETRA I ŽUČ	pospješuje bolji rad jetre i izlučivanje žuči, pomaže jetri neutralizirati štetne tvari, te pomaže kod bolesti i oštećenja jetre, upale žučnog mjehura i žučnih kanala, žutice, žučnog pijeska i žučnog kamenca

1.2. RAZMNOŽAVANJE BILJAKA U UVJETIMA *in vitro*

1.2.1. STERILIZACIJA BILJNOG MATERIJALA

Prije uvo enja bilo koje biljne vrste u kulturu *in vitro* nužno je provesti temeljnu i pravilnu sterilizaciju (Jelaska, 1994). Mikroorganizmi koji naj eš e one iš uju biljna tkiva jesu bakterije i virusi, no to mogu biti tako er i gljivice, crvi i, resokrilci, te razni drugi sitni organizmi. Biljni materijal koji se koristi za uvo enje u kulturu *in vitro* može rasti u kontroliranim uvjetima, npr. u staklenicima, ili to mogu biti biljke koje rastu na otvorenom. U ovom potonjem slu aju puno je teže osloboditi biljni materijal od mnogih infekcija, pa se stoga biljke ponekad prvo prenose u kontrolirane uvjete (staklenik) i tretiraju pesticidima i fungicidima. U istraživa kom radu preporu a se koristiti biljna tkiva koja su u istom razvojnom stadiju, te su rasla u stakleniku ili klima-komori (Jelaska, 1994).

Nažalost neke se bakterije teško otkriju i uklone sterilizacijom, te se zato opisuju kao latentne ili endogene (Fisse i sur., 1987; George i Sherrington, 1984; Leifert i Waites, 1990). Biljni materijal zaražen takovim mikroorganizmom može se bez poteško a razmnožavati u uvjetima *in vitro*, no nakon uvo enja u kulturu *in vivo* esto izaziva širenje bolesti (Cassells i sur., 1988; Deimling i Mollers, 1988). Da se to ipak ne bi dogodilo razvijene su razli ite metode odre ivanja latentnih kontaminacija (Knauss, 1976; Cassells, 1986; Boxus i Terzi, 1987). Bit takovih metoda jesu podloge koje su sli nog sastava kao i one za rast mikroorganizama. Na njih se nasade biljni eksplantati i prati se eventualni razvoj infektanata.



Slika 3. Komora sa sterilnim protokom zraka (laminar) u kojem se sterilno biljno tkivo uvodi u kulturu *in vitro*.

Infekcije u kulturi *in vitro* javljaju se radi zaraženosti biljnog materijala uvedenog u kulturu, kontaminacije hranidbene podloge, kontaminiranog zraka u laminaru (slika 3) ili nepažnje pri radu.

Da bi se maksimalno spriječio ulazak mikroorganizama u kulturu biljnog tkiva *in vitro*, mora se provesti sterilizacija biljnog materijala od kojeg se uzimaju eksplantati, zatim treba sterilizirati same eksplantate, te konačno hranjivu podlogu, mjesto na kojem se vrši inokulacija i pribor. Poželjno je tako i tijekom rada povremeno prskati ruke alkoholom (70%-tni etanol).

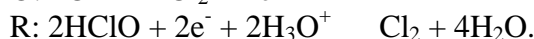
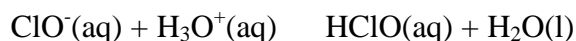
Po etni eksplantat uranja se u 70%-tni etanol, a zatim u sredstvo za sterilizaciju (natrijev i kalcijev hipoklorit, živin ili srebrov klorid, vodikov peroksid) uz dodatak detergenta, te se konačno ispere sterilnom vodom. Ukoliko se ne bi provela površinska sterilizacija, mikroorganizmi s površine tkiva mogu kontaminirati hranjivu podlogu.

Tako tretirani materijal reže se na komade u sterilnim uvjetima u laminaru te se još jednom površinski sterilizira. Za uspješnost površinske sterilizacije izuzetno je važno da biljni materijal bude svjež (Pintari, 2008).

1.2.1.1. Izosan-G, granulat za opću dezinfekciju i sanitaciju vode

Izosan-G je stabilni klorni dezinficijens u obliku granulata bijele boje, karakterističnog mirisa na klor. Sadržava troklozen natrij koji snažno djeluje na vegetativne oblike gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, na gljive, alge, protozoe i na brojne viruse. Slabiji učinak ima na acidorezistentne bakterije i na bakterijske spore.

Troklozen natrij u vodenoj otopini disocira u hipoklornu kiselinu i hipokloritni ion, koji zajedno slobodni aktivni klor u vodi (Filipović i Lipanović, 1995):



Učinak troklozena natrija temelji se na otpuštanju slobodnog aktivnog klora. Za snažnu antimikrobnu aktivnost zaslužna je neionizirana hipoklorna kiselina koja je 80 do 100 puta jači germicid od hipokloritnog iona. Hipoklorna kiselina ireverzibilno oštećuje stanične enzimske sustave. Djelotvornost klornih otopina opada s porastom pH vrijednosti (najveća u području od 4 do 7). Odnos hipoklorne kiseline i hipokloritnih iona ovisi o pH vrijednosti

otopine u kojoj se oni zajedno nalaze. Pri neutralnom i blago lužnatom (7,5) njihov omjer je izjedna en. Najve u koncentraciju neionizirane hipoklorne kiseline nalazimo pri pH vrijednosti oko 6. Takovu vrijednost imaju razrije ene otopine natrij dikloroizocijanurata pa sadržavaju 97% hipoklorne kiseline, a samo 3% hipoklorita. Nasuprot tome, radne otopine pripravaka hipoklorita imaju pH vrijednost oko 9 i u njima se pretežno nalaze hipokloritni ioni. Zato Izosan-G ima mnogo ja i germicidni u inak.

Otopljen u vodi, troklozen natrij daje razinu od 55 do 56% slobodnog aktivnog klora, ime se postiže optimalni germicidni u inak. Aktivnost troklozen natrija neznatno se smanjuje u prisutnosti organskih tvari, naro ito bjelan evina ili velikog broja mikroorganizama.

1.2.1.2. Vodikov peroksid kao dezinfekcijsko sredstvo

Vodikov peroksid dezinficijens je visokog stupnja djelotvornosti, što zna i da razara i inaktivira ve inu mikroorganizma, ak i neke bakterijske spore. Dobro sterilizacijsko djelovanje vodikovog peroksida leži u njegovoj kemijskoj strukturi i oksidativnoj prirodi.

1.2.1.3. Živin(II) klorid kao dezinfekcijsko sredstvo

Živin(II) klorid spoj je dobro topiv u vod, te je prili no otrovan. Upravo zahvaljuju i tim svojstvima upotrebljava se kao antiseptik. Otopine korištene u tu svrhu jako su razrije ene (od 0,01 do 0,05%, tj. od 0,1 do 1% za drvenaste vrste koje su rasle na otvorenom; Jelaska, 1994). HgCl_2 se dobiva zagrijavanjem žive u kloru, ali može se dobiti i zagrijavanjem smjese živinog(II) sulfata i natrijevog klorida (Filipovi i Lipanovi , 1995). Iz te smjese živin(II) klorid sublimira, pa se trivijalno spoj naziva sublimat:



Postupak sterilizacije živinim(II) kloridom mora se provoditi isklju ivo u staklenom posu u jer otopina u dodiru s metalima stvara amalgame.

1.2.2. RAZMNOŽAVANJE BILJAKA *in vitro*

1.2.2.1. Inokulacija i supkultiviranje

Inokulacija je izraz kojim se označava uvođenje eksplantata, presadnice ili tkiva na hranjivu podlogu, a supkultiviranje je pak postupak kojim se određena kultura prenosi na novu hranjivu podlogu (Jelaska, 1994). Najčešći razlozi supkultiviranja jesu istrošena ili osušena „stara“ hranjiva podloga ili pak dalje umnažanje (multiplikacija) materijala. Inokulaciju i supkultiviranje treba provoditi u sterilnim uvjetima, najbolje u komorama sa strujanjem sterilnog zraka, te sterilnim priborom.

1.2.2.2. Kultura aksilarnih (bočnih) pupova

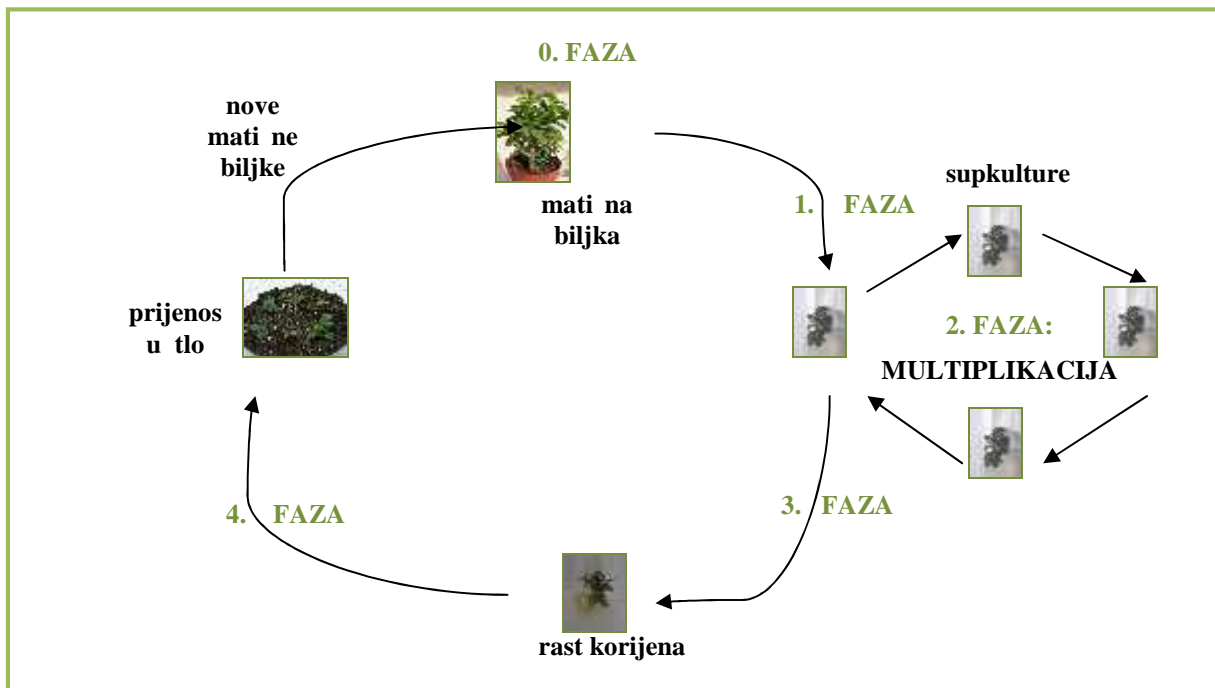
Već tisućljeva uvijek koristi biljke u svakodnevnom životu i na mnogo načina. Kroz povijest otkrio je načine kako maksimalno iskoristiti samu prirodu tih živih bića. Nesporni način razmnožavanja bilja (vegetativno razmnožavanje) uvelike je korisno i koristi ljudskoj civilizaciji. Vegetativno razmnožavanje u uvjetima *in vivo* u poljoprivredi se koristi već dugi niz godina. No nakon što se pokazalo da se puno veći broj vrsta uspješnije i brže može razmnožavati u uvjetima *in vitro*, razvijene su brojne tehnike koje to omogućavaju. Ipak od svih postojećih tehnika kulture biljnog tkiva i stanica, kloniranje je našlo najširu primjenu. Neke prednosti i nedostaci te tehnike prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Neke prednosti i nedostaci mikrorazmnožavanja u uvjetima *in vitro* (Jelaska, 1994).

PREDNOSTI	NEDOSTACI
✓ brže razmnožavanje nego u uvjetima <i>in vivo</i>	– neke vrste imaju nisku genetsku stabilnost
✓ neke vrste se ne mogu razmnožiti u uvjetima <i>in vivo</i> , ali mogu u uvjetima <i>in vitro</i>	– biljke mogu nakon prijenosa u uvjete <i>in vivo</i> pokazati grmoliki rast ili povrat u juvenilnu fazu
✓ brži i snažniji rast u sterilnim uvjetima	– teško se potiče i zakorjenjivanje drvenastih vrsta
✓ potrebno malo početnog materijala	– biljka može izgubiti regenerativnu sposobnost stanica i tkiva nakon određene količine supkultura
✓ nema utjecaja godišnjih doba i vegetacijske sezone	

Umnažanje se u uvjetima *in vitro* provodi jednom od sljedećih metoda: pojedinačni nodijski segmenti, aksilarno grananje ili regeneracija adventivnih organa. Važno je u postupku mikrorazmnožavanja koristiti što mlađe razvojne stadije biljke jer oni imaju veći regeneracijski potencijal. Isto tako valja reći i da je velika razlika umnažanja *in vitro* između

drvenastih i zeljastih biljaka. Drvenaste biljke je puno teže razmnožavati u uvjetima *in vitro* prvenstveno zbog manjeg regeneracijskog potencijala.



Slika 4. Faze u vegetativnom razmnožavanju u uvjetima *in vitro*.

Slika 4 sažeto prikazuje glavne faze u vegetativnom razmnožavanju biljnog tkiva *in vitro*:

- NULTA ILI PO ETNA FAZA uključuje brigu o matičnoj biljci koja će dati početne eksplantate. Ova faza uključuje sve postupke prije početka kulture *in vitro*.
- PRVA FAZA podrazumijeva uvođenje biljnoga tkiva u kulturu. Tu se vrši sterilna izolacija eksplantata, meristema ili nekog drugog dijela biljke koji će poslužiti kao polazni materijal.
- DRUGA FAZA, tj. umnožavanje (multiplikacija) za glavni cilj ima umnožiti inokulirani dio bez gubitka genetičke varijabilnosti.
- TREĆA FAZA: Bilo koji izdanak uzgojen prethodnom fazom može se pripremiti za prijenos u tlo. Upravo to se ostvaruje ovom fazom. Prvenstveno je bitno potaknuti izduživanje izdanka i stvaranje korijena. To se postiže specifičnim omjerima regulatora rasta u hranjivim podlogama.

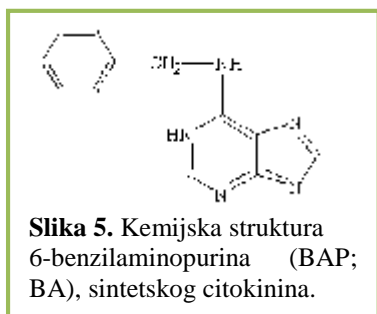
- ETVRTA FAZA omoguće prijenos biljke s hranjive podloge u tlo i proces aklimatizacije, da bi se u konačnici rast i razvoj biljke nastavio u uvjetima *in vivo*.

Izdanci se mogu množavati na nekoliko načina, no u praksi se najvažnijom pokazala metoda aksilarnog pupanja. Navedena metoda podrazumijeva izolaciju vegetacijskog vrška i induciranje rasta aksilarnih pupova u pazušcima lista na podlozi s visokom koncentracijom citokinina (Jelaska, 1994). Metoda aksilarnog pupanja često se kombinira s metodom pojedinačnih nodija koja ne zahtjeva dodavanje citokinina u podlogu. Metoda pojedinačnih nodija podrazumijeva izolaciju pupa u pazušcu lista zajedno s pripadajućim dijelom stabljike. U konačnici se tako izolirani eksplantat površinski sterilizira, te inokulira na specifičnu hranjivu podlogu. Kulture se obavljaju u klima-komorama s točno određenom temperaturom i postotkom vlage, te količinom i intenzitetom svjetlosti. Vremenski period između razdvajanja jedne kulture na dvije zasebne supkulture (ponovna izolacija eksplantata i inokulacija na novu hranjivu podlogu) iznosi oko četiri tjedna (30-ak dana).

1.3. BILJNI REGULATORI RASTA

Baš kao ni životinjski ili ljudski organizmi, tako niti biljni organizam ne može funkcionirati bez hormona. Budući da biljni hormoni prvenstveno utječu na rast i razvoj, nazivamo ih još i regulatorima rasta. Razlikujemo pet skupina biljnih regulatora rasta: citokinini, giberelini i auksini koji stimuliraju rast, te etilen i abscisinska kiselina koji inhibiraju rast biljnoga tkiva (Pevalek-Kozlina, 2002).

1.3.1. CITOKININI



Još je u XIX. stoljeću njemački znanstvenik Wiesner zaključio da stani na dioba ima endogeni uzrok. Otprilike pola stoljeća kasnije Jablonski i Skoog eksperimentiraju s parenhimbim tkivom duhana (*Nicotiana tabacum*) i otkrivaju da se parenhimske stanice dijele ako ih se stimulira floemskim tkivom ili nekim drugim tvarima (npr. adeninom). Provodili su brojne pokuse s tvarima koji sadrže purine, između ostalog i s

DNA iz sperme haringe. Upravo iz tog uzorka prvi su izolirali kinetin (6-furfurilaminopurin), te su zaključili da se u biljkama nalaze spojevi kemijski slični kinetinu.

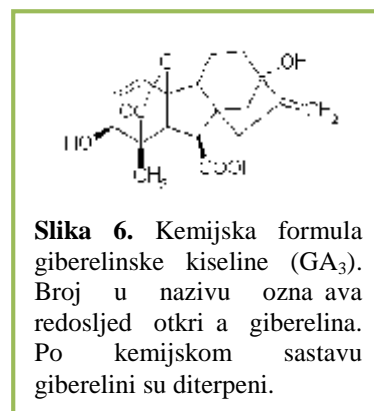
Prvi prirodni citokinin izolirali su 1963. Letham i Miller (neovisno) iz nezrelog endosperma kukuruza (*Zea sp.*), pa su ga nazvali zeatin. No danas se u kulturi biljnog tkiva najčešće koriste sintetski citokinini (slika 5).

Po kemijskom sastavu citokinini su N⁶-supstituirani derivati adenina. Svi oni citokinini koji se prirodno javljaju u biljkama i algama derivati su izopentenil-adenina. Mjesto sinteze ovih regulatora rasta je u meristemu korijena, te u embriju i plodovima, a u biljci se prenose ksilemom. U biljci mogu biti slobodni ili vezani za šećer i tRNA. Koncentracija citokinina u biljaka regulirana je sintezom, odnosno razgradnjom, te oslobađanjem vezanih citokinina i prijenosom (Pevalek-Kozlina, 2002).

Neki fiziološki učinci citokinina navedeni su u tablici 3.

1.3.2. GIBERELINI

Gljivica *Gibberella fujikuroi* je početkom prošlog stoljeća u Aziji uzrokovala „bolest ludih biljaka“, nazvanu tako jer su stabljike zaražene riže uslijed visokog rasta polijegale uz tlo. Japanski znanstvenik Kurosawa 1926. godine izolirao je tvar iz filtrata kulture gljivica koje su uzrokovale produženi rast stabljike i listova riže, te nemogućnost donošenja sjemenki. Prvi prirodni biljni giberelin izoliran je iz sjemenke graha (*Phaseolus coccineus*) sredinom prošlog stoljeća (1958.). Daljnje analize pokazale su da su giberelini po kemijskom sastavu diterpeni (slika 6), a svi oni koji su u biljci aktivni sadrže 19 ili 20 ugljikovih atoma.



Slika 6. Kemijska formula giberelinske kiseline (GA₃). Broj u nazivu označava redosljed otkrića giberelina. Po kemijskom sastavu giberelini su diterpeni.

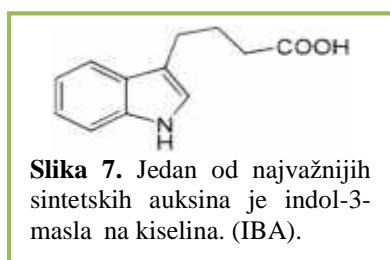
Glavno mjesto sinteze giberelina su mladi listovi vršnog pupa, no sintetiziraju se i u svim meristemskim tkivima izdanka i korijena. Također do sinteze može doći i u starijim listovima koji su još u razvoju, vrhovima korijena, te nezrelim sjemenkama. U biljkama se prenose floemom.

Giberelini imaju široku komercijalnu upotrebu, posebice u voćarstvu. Povećavaju veličinu bobica grožđa, te razvoj plodova bez sjemenki, a u plodovima citrusa odgađaju starenje. Budući da stimuliraju sintezu α -amilaze, koriste se u proizvodnji šećera iz šećerne trske i proizvodnji slada iz ječma. Neki važniji fiziološki učinci giberelina nalaze se u tablici 3. (Pevalek-Kozlina, 2002)

1.3.3. AUKSINI

Još je slavni Charles Darwin, promatraju i reakcije biljaka na svjetlost, zaključio da se u vršku koleoptile sintetiziraju tvari koje uzrokuju savijanje donjeg dijela i reakciju na podražaj. Detaljnije pokuse proveo je Boysen-Jensen i objasnio da je savijanje koleoptile posljedica produžnog rasta na strani bez podražaja. Konačno je Went uspio izolirati tvar koju danas nazivamo auksinom.

Glavna fiziološka djelovanja auksina su produžni rast stanica i reakcija na jednostrane podražaje (još neki fiziološki učinci dani su u tablici 3). Najvažniji prirodni



auksin je indol-3-octena kiselina (IAA), dok ih je mnogo i sintetizirano (slika 7). Primarna mjesta sinteze u biljci jesu meristemska tkiva: vršni meristemi izdanka, mladi listovi, te plodovi. No sinteza se može odvijati i u odraslim listovima, te vrškovima korijena. Ukoliko nisu slobodni, auksini mogu biti vezani za šećere ili aminokiseline. U biljkama postoje dva

osnovna sustava za prijenos auksina: jednosmjerni polarni prijenosni sustav za koji je potrebna energija i pasivni nepolarni prijenos floemom (Pevalek-Kozlina, 2002).

Tablica 3. Najvažniji fiziološki učinci citokinina, giberelina i auksina.

CITOKININI	GIBERELINI	AUKSINI
<ul style="list-style-type: none"> • regulacija staničnog ciklusa • kontrola morfogeneze u kulturi tkiva • odgoda starenja listova (mobilizacija hranjivih tvari) • povećanje stanica u kotiledonima i listovima (mogu inhibirati rast u stabljici i korijenu) • poticanje rasta bočnih pupova (antagonisti auksinu) • indukcija sinteze enzima 	<ul style="list-style-type: none"> • stimulacija produžnog rasta stabljike, posebno rozetnih i patuljastih biljaka • indukcija cvjetanja u biljaka s rozetom • promjena spola cvijeta • stimulacija diobe i produžnog rasta • kontrola promjene juvenilna/adultna faza • povećanje apikalne dominacije • prekid dormancije vršnih pupova i sjemenki • indukcija klijanja (stimulacija sinteze α-amilaze) 	<ul style="list-style-type: none"> • stimulacija apikalne dominacije (antagonisti citokininu) • odgoda otpadanja listova i plodova u ranijoj fazi • razvoj adventivnog korijenja i plodova (inhibicija produžnog rasta korijena) • indukcija partenokarpije • produžni rast stabljike i koleoptile • razvoj provodnog tkiva u listu

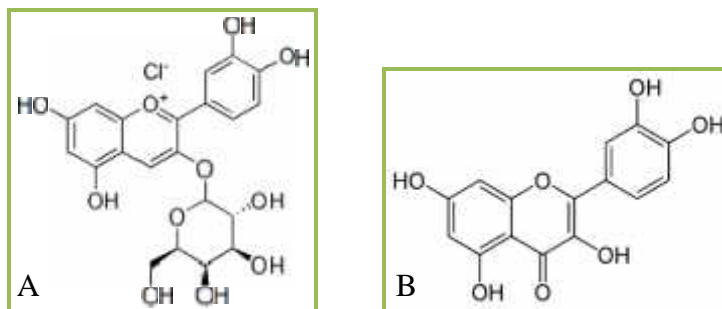
1.4. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA VRSTE *Aronia melanocarpa* Michx.

Makar su aroniju već dobro poznavali i koristili domorodački Indijanci Novoga svijeta, u Europi ova vrsta postala je znanstveno zanimljiva tek sredinom prošlog stoljeća. Kada je otkrivena njezina izrazito velika nutritivna i ljekovita vrijednost, poela se sve više istraživati. Ipak još uvijek se ne može pohvaliti velikim brojem objavljenih radova kao neke druge vrste iz iste porodice.

Po etkom devedesetih godina prošlog stoljeća provedeno je nekoliko istraživanja s crnoplodnom aronijom. Petrović i Jakimović-Plavšić (1992) pratile su razmnožavanje i zakorjenjivanje na krutom i tekućem mediju. Rezultati su pokazali da je kruta podloga bolja pri multiplikaciji *in vitro* jer u prosjeku dala je već i broj izdanaka (6,9) nego li tekuća hranjiva podloga (5,9). Isto tako pokazalo se da su na tekućem mediju izdanci kraći. U istraživanje je bio uključen i hibrid stvoren križanjem („Albigowianka“), te je u konačnici provedena usporedba u stopi razmnožavanja i zakorjenjivanja s kulturom crnoplodne aronije. Pokazalo se da je hibrid uspješniji u aklimatizaciji i zakorjenjivanju u uvjetima *in vivo*, dok je ista roditeljska linija bolja za multiplikaciju u uvjetima *in vitro*. Rezultati istraživanja Ružić (1993) pokazali su pak da je stopa preživljavanja i zakorjenjivanja aronije bila najveća na podlozi MS s dodatkom $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ IBA, te $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ GA₃.

Tijekom tri godine Jeppsson (2000) je pratio promjenu količine antocijana u plodovima, te visinu izdanaka crnoplodne aronije. Istraživanje je provedeno u Švedskoj na tlu s pH vrijednosti 5,5. Rezultati su pokazali da su se stopa rasta i količina antocijana u plodovima povećavale s vremenom. U tri godine jedinke su narasle za polovicu po etne visine, a količina antocijana u plodovima porasla je za više od 50% po etne količine. Zanimljivo je spomenuti da je urod u drugoj godini porastao, da bi u trećoj drastično pao.

Jedno novije istraživanje (Jakobek i sur., 2007; www.borovnicaunas.hr) bavilo se količinom značajnih sekundarnih metabolita u aronije i ostalih bobasti voćaka. Pokazalo se da aronija ima daleko najviše polifenola, čak 10637 mg kg^{-1} , dok je jagoda na drugom mjestu s tek 1005 mg kg^{-1} . Antioksidansa je najviše bilo u plodovima aronije i jagode, iznoseći 232 i 4341 mg kg^{-1} . Nadalje rezultati su pokazali da je najzastupljeniji antocijan u aroniji cijanidin-3-galaktozid (68,9%), a od flavonola čak 93,07% odnosi se na kvercetin (slika 8).



Slika 8. Antocijani i flavonoli su sekundarni biljni metaboliti, te spadaju u skupinu fenola. Upravo od antocijana potječe karakteristična tamna boja ploda aronije. Najzastupljeniji antocijan u crnoplodnoj aroniji je cijanidin-3-galaktozid (A), a flavonol s najvećim udjelom je kvercetin (B).

Od istraživanja koja su u tijeku korisno je spomenuti nekoliko. Na američkom Sveučilištu Illinois istraživanja se provode u svrhu otkrivanja potencijala aronije u liječenju kardiovaskularnih bolesti, te suzbijanju tumora. Dr. Bernadine Strick pak, na Sveučilištu u Oregonu, testira brojne varijetete aronije ne bi li otkrio najkvalitetniji i najproduktivniji (www.borovnicaunas.hr).

U Europi se aronija sve više istražuje u svrhu proizvodnje kvalitetnih crnih vina. Naime u Rusiji i Litvi sok aronije zajedno s jabukom podvrgava se fermentaciji ne bi li se proizvelo crno vino. Tom Plocher u tu svrhu kombinira aroniju s vinima (grožanim) kako bi poboljšao udio šećera i tanina u vinu, te kako bi vino imalo što zavodljiviju boju (www.borovnicaunas.hr).

Danas se puno govori o važnosti zdrave prehrane i o nutritivnim vrijednostima namirnica. Mediji su puni informacija o djelovanju pojedinih sastojaka hrane koju konzumiramo. U svijetu se provode brojna istraživanja kako bi se dobio što bolji uvid u značajno djelovanje namirnica. Od nedavno i aronija se našla na listi najistraživanijih vrsta.

Dosadašnja istraživanja prikazala su aroniju kao biljku koja može biti višestruko korisna. Njeni plodovi izrazito su bogati vrijednim tvarima za ljudsko zdravlje, a predivne boje lišća u jesen, te cvjetova u proljeće daju joj zasluženom mjesto u brojnim vrtovima. Sve to zasigurno je pridonijelo da aronija bude predmet i ovog istraživanja.

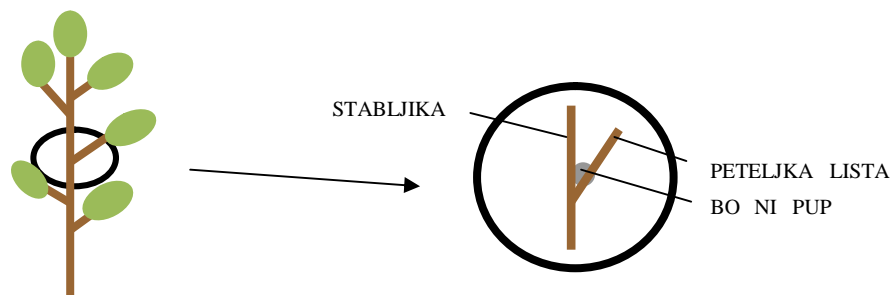
II. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada bio je uvesti vrstu *Aronia melanocarpa* u kulturu *in vitro*, te razviti metodu brze multiplikacije. Po etni eksplantati sterilizirani su Izosanom-G i vodikovim peroksidom ili Izosanom-G i živinim kloridom. Nakon uvo enja u kulturu istražena je stopa umnažanja izdanaka na MS hranjivoj podlozi u koju su dodani 6-benzilaminopurin (BA; 0,5 mg dm⁻³ i 1,0 mg dm⁻³), giberelinska kiselina (GA₃; 0 i 0,5 mg dm⁻³) i indol-3-masla na kiselina (IBA; 0 i 0,1 mg dm⁻³).

III. MATERIЈAL I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

Po etni eksplantati dobiveni su rezanjem granica crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* Michx.). Svaki eksplantat bio je veličine do jedan centimetar, te je sadržavao po jedan bojni pup (slika 9). Tako pripremljeni eksplantati sterilizirani su, te nasađeni na MS hranjivu podlogu s različitim koncentracijama biljnih regulatora rasta.



Slika 9. Eksplantati su dobiveni rezanjem granice aronije na dijelove od jednog centimetra.

3.2. METODE

3.2.1. STERILIZACIJA BOJNIH PUPOVA

Po etni eksplantati su površinski sterilizirani, isprani destiliranom vodom, posušeni i nasađeni u listovima sterilnog filter papira te nasađeni na podlogu MS (po jedan eksplantat u jednoj epruveti). Postupak sterilizacije proveden je na dva različita načina: 5%-tnim Izosanom-G (90%-tni natrijev dikloroizocijanurat dihidrat, $C_3N_3O_3Cl_2 \cdot 2H_2O$, Pliva, Zagreb) u kombinaciji sa 6%-tnim vodikovim peroksidom, te 1%-tnim Izosanom-G u kombinaciji s 2%-tnim $HgCl_2$ (tablica 4).

Tablica 4. Tijek sterilizacije bojni pupova crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* Michx.).

	KEMIKALIJA	VRIJEME / min	KEMIKALIJA	VRIJEME / min
1.	5% Izosan-G	5	1% Izosan-G	5
2.	dH ₂ O	3 x 5	dH ₂ O	3 x 5
3.	6% H ₂ O ₂	5	2% HgCl ₂	5
4.	dH ₂ O	3 x 5	dH ₂ O	3 x 5

3.2.2. MULTIPLIKACIJA IZDANAKA U KULTURI *in vitro*

3.2.2.1. Hranjive podloge

Eksplantate crnoplodne aronije nasa ivala sam na MS hranjivu podlogu (Murashige i Skoog, 1962; tablica 5) u koju su dodani biljni regulatori rasta: 6-benzilaminopurin (BA; 0,5 mg dm⁻³ i 1,0 mg dm⁻³), giberelinska kiselina (GA₃; 0 i 0,5 mg dm⁻³) i indol-3-masla na kiselina (IBA; 0 i 0,1 mg dm⁻³). Kontrolne biljke uzgojene su na MS hranjivoj podlozi bez dodatka regulatora rasta. pH vrijednost hranjive podloge iznosila je 5,7.

Tablica 5. Sastav osnovne hranjive podloge MS s dodatkom 30 g dm⁻³ saharoze i 8 g dm⁻³ agara.

	KEMIJSKI NAZIV	KEMIJSKA FORMULA	mg dm ⁻³	mmol dm ⁻³
MAKRO - ELEMENTI	kalijev nitrat	KNO ₃	1900,0	18,8
	amonijev nitrat	NH ₄ NO ₃	1650,0	20,6
	kalcijev diklorid	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440,0	2,99
	magnezijev sulfat	MgSO ₄ · H ₂ O	370,0	1,5
	kalijev dihidrogenfosfat	KH ₂ PO ₄	170,0	1,25
MIKROELEMENTI	natrijev etilendiaminoacetat	Na ₂ N ₂ C ₁₀ O ₈ H ₁₄	37,3	0,1
	željezov sulfat	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	0,1
	manganov sulfat	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	0,1
	cinkov sulfat	ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6	0,029
	borna kiselina	H ₃ BO ₃	6,2	0,1
	kalijev jodid	KI	0,83	0,005
	natrijev molibdenat	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,001
	bakrov sulfat	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,0001
	kobaltov klorid	CoCl ₄ · 6H ₂ O	0,025	0,0001
	ORGANSKI DODACI	glicin	C ₂ H ₅ O ₂ N	2,0
m-inozitol		C ₆ H ₁₂ O ₆	100,0	0,55
nikotinska kiselina		C ₆ H ₆ O ₂	0,5	0,0041
piridoksin - HCl		C ₈ H ₁₁ NO ₃ ⁺ Cl ⁻ HCl	0,5	0,0024
tiamin - HCl		C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS ⁺ Cl ⁻ HCl	0,1	0,0003

3.2.2.2. Sterilizacija pribora i podloga

Nasa ivanje eksplantata na hranjivu podlogu vršila sam u laminaru (komora s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka) koji sam prethodno sterilizirala 96%-tnim etanolom. Sav pribor (stakleni i metalni) autoklavirala sam na 0,15 MPa, pri temperaturi od 124 °C u trajanju od 45 minuta. Hranjive podloge sam tako er sterilizirala u autoklavu pri istom tlaku i temperaturi, ali u trajanju od 18 minuta. Nakon autoklaviranja hranjive podloge su uvane u sterilnoj komori do po etka rada.

Nakon inokulacije vrh svake epruvete sterilizirala sam provla enjem kroz plamen, zatim sam je za epila vatom i aluminijskom folijom.

Metalni pribor (skalpeli i pincete) sterilizirala sam dodatno tijekom rada uranjanjem u 96%-tni etanol i spaljivanjem.

3.2.3. VANJSKI UVJETI KULTURE

Inokulirane kulture inkubirane su u klima komori uz 16-satno osvjetljenje bijelom svjetloš u (fluorescentne cijevi, 40 W, 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Temperatura u komori bila je 24 ± 2 °C. Trajanje supkulture iznosilo je trideset dana.

3.3. STATISTI KA OBRADA PODATAKA

Stopa umnažanja pra ena je kroz tri supkulture, u svakoj supkulturi analizirano je po 12 eksplantata. Prikazani rezultati aritmeti ka su sredina 12 replika (rezultati za pojedine supkulture), odnosno 36 replika (prosje ni rezultati svih triju supkultura). Odstupanje od aritmeti ke sredine izraženo je kao standardna pogreška.

Za statisti ku analizu podataka koristila sam analizu varijance (ANOVA) i Newman-Keulsov test za utvr ivanje zna ajnosti razlika izme u pojedinih tretmana na razini $P < 0,05$. Analize sam izvela pomo u ra unalnog programa Statistica 8.0. (Stat Soft Inc., SAD).

IV. REZULTATI

4.1. STERILIZACIJA EKSPANTATA VRSTE *Aronia melanocarpa* Michx.

Po etni eksplantati su površinski sterilizirani i nasa eni na hranjivu podlogu MS. Šest tjedana nakon sterilizacije s 5%-tnim Izosanom-G u kombinaciji sa 6%-tnim vodikovim peroksidom, 91% eksplantata ostalo je sterilno. Sterilizacija s 1%-tnim Izosanom-G u kombinaciji s 2%-tnim HgCl₂ bila je preagresivna te rezultirala nekrotizacijom eksplantata.

4.2. UMNAŽANJE IZDANAKA VRSTE *Aronia melanocarpa* Michx.

Izdanke razvijene u po etnoj kulturi presa ivala sam na podloge MS s punom koncentracijom makroeleminata, u koju je dodano 30 g dm⁻³ saharoze, 8 g dm⁻³ agara te biljni regulatori rasta: 6-benzilaminopurin (BA; 0,5 mg dm⁻³ i 1,0 mg dm⁻³), giberelinska kiselina (GA₃; 0 i 0,5 mg dm⁻³) i indol-3-masla na kiselina (IBA; 0 i 0,1 mg dm⁻³).

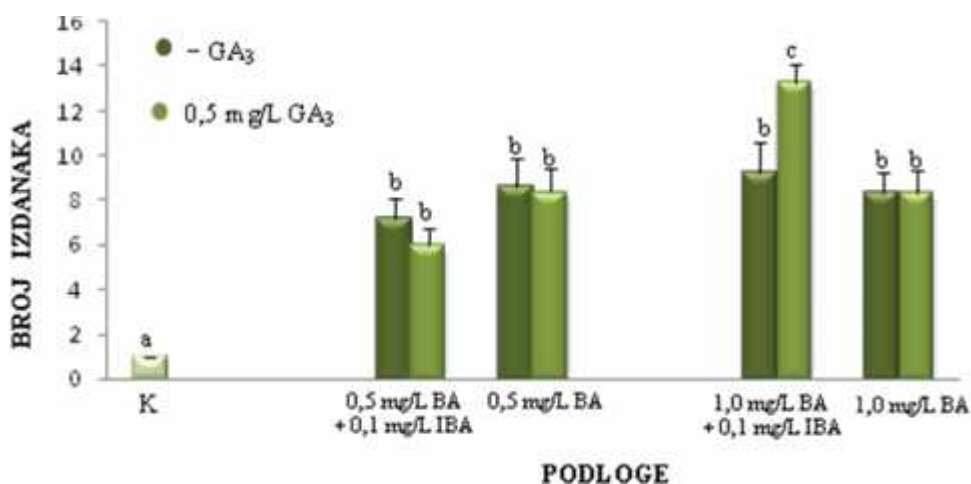
Odabir hranjivih podloga napravljen je na temelju rezultata preliminarnih istraživanja koji su pokazali značajan utjecaj BA, GA₃ i IBA na multiplikaciju. Uspostavljeno je da IBA bitno utječe na razvoj adventivnog korijenja, ali značajno doprinosi i multiplikaciji. Optimalna koncentracija GA₃ je 0,5 mg dm⁻³, a citokinina BA od 0,5 do 1,0 mg dm⁻³. Tijekom preliminarnih istraživanja također je utvrđeno da je uspješnija multiplikacija postignuta na podlozi s punom koncentracijom makroeleminata (MS) nego na podlozi s polovinom koncentracijom makroeleminata (1/2MS). Dodatak arginina u hranjivu podlogu rezultirao je obilnim stvaranjem kalusa zbog čega je izostavljen iz daljnjih istraživanja.

4.2.1. PRVA SUPKULTURA

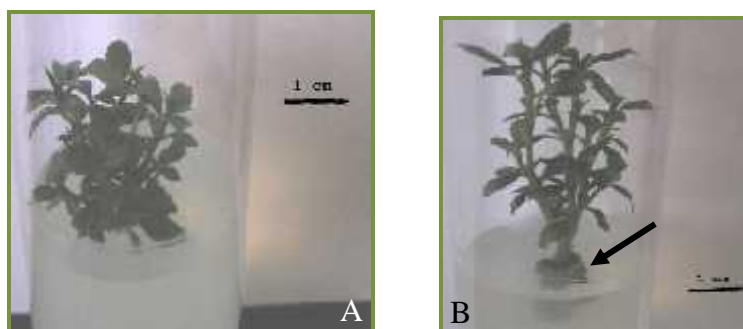
U prvoj supkulturi najveći broj izdanaka razvio se na podlozi s dodatkom 1,0 mg dm⁻³ BA, 0,5 mg dm⁻³ GA₃ i 0,1 mg dm⁻³ IBA, dok je najmanje uspješna multiplikacija ostvarena na podlozi s istim koncentracijama IBA i GA₃ ali s nižom koncentracijom BA (0,5 mg dm⁻³; slika 10). Na podlogama s 0,5 mg dm⁻³ BA izdanci su bili snažniji i kraći (slika 11 A), dok su oni na podlogama s 1,0 mg dm⁻³ BA bili duži i tanji (slika 11 B). Na podlogama s dodatkom 0,5 mg dm⁻³ BA također sam primijetila razvitak listića manje površine. Karakteristično je pak za podlogu s 0,5 mg dm⁻³ BA, bez GA₃ i IBA da su listovi približno jednake veličine. Kad je pak u podlozi bilo GA₃ i IBA, listići su bili veći i ukoliko ih je bilo manje na izdanku. Na podlozi s 0,5 mg dm⁻³ GA₃ i s 0,5 mg dm⁻³ BA, ali bez IBA glavna os izdanka prilično zadeblja pri dnu.

Usporede li se podloge s i bez indol-3-masla ne kiseline (IBA), može se primijetiti da se broj razvijenih izdanaka na podlogama bez auksina statistički značajno ne razlikuje neovisno o prisutnosti drugih regulatora rasta (slika 10).

Kalus se razvio na svega 11 eksplantata od ukupno 96 (11,4%). Od tih 11 eksplantata s kalusom, čak osam ih je razvijeno na podlogama koje su sadržavale indol-3-masla ne kiselinu (72,7%).



Slika 10. Srednja vrijednost broja izdanaka u prvoj supkulturi na podlozi MS s različitim koncentracijama regulatora rasta. Rezultati označeni različitim slovima statistički se razlikuju ($P < 0,05$).



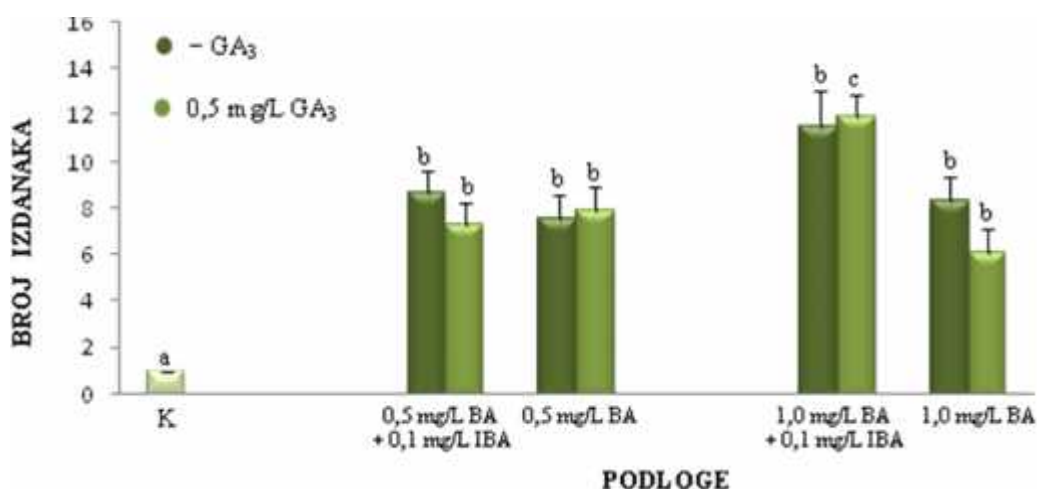
Slika 11. Kultura crnoplodne aronije na hranjivoj podlozi s $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ (A) i $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ citokinina BA (B). Također se na slici B može vidjeti kalus (označen strelicom).

4.2.2. DRUGA SUPKULTURA

Općenito se za drugu supkulturu može reći da su podloge koje sadrže $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ BA pogodovale stvaranju brojnih ogranaka pri čemu je glavna os izdanka nastavila rasti u visinu. Za razliku od njih, podloge s višom koncentracijom BA ($1,0 \text{ mg dm}^{-3}$) pogodovale su razvoju rozete. Prisutnost IBA rezultirala je uspješnijom multiplikacijom: prosječni broj

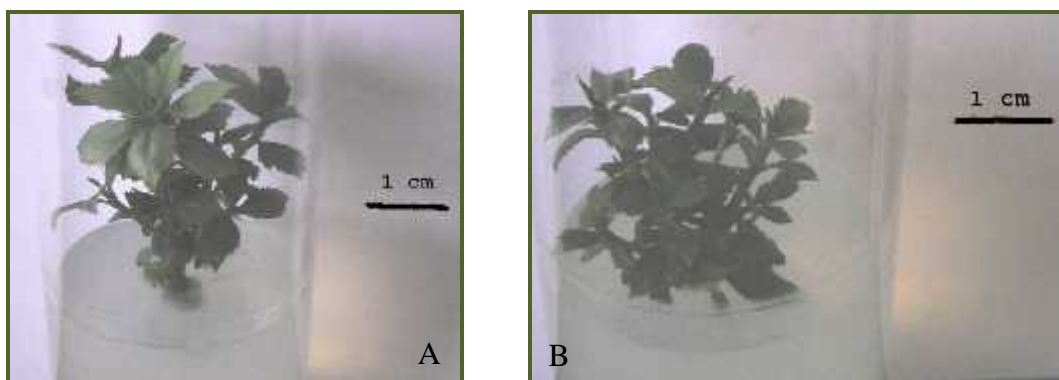
izdanaka na podlozi s IBA iznosio je 9,83, dok je na podlozi bez IBA bio 7,46 izdanaka po eksplantatu. Giberelin je poveao stopu multiplikacije ako su u podlozi bili prisutni IBA u koncentraciji $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ i BA u koncentraciji $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ (slika 12). Kad u podlozi nije bilo auksina, broj izdanaka je bio ve i u podlozi s $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ BA ukoliko je prisutna i giberelinska kiselina ($0,5 \text{ mg dm}^{-3}$) (slika 12).

Eksplantati nasa eni na podlogu bez giberelina ali s $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ BA i $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ IBA, razvili su zna ajno više izdanaka nego u prvoj supkulturi. Srednja vrijednost multiplikacije u prvoj supkulturi iznosila je 9,27, a u drugoj supkulturi 11,5 izdanaka po eksplantatu. Najmanji broj izdanaka po eksplantatu razvio se na podlozi koja je sadržavala $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ BA i $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ GA₃ (bez IBA, slika 12).



Slika 12. Srednja vrijednost broja izdanaka u drugoj supkulturi na MS podlozi s razli itim koncentracijama regulatora rasta. Rezultati ozna eni razli itim slovima statisti ki se razlikuju ($P < 0,05$).

Na podlozi s $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ BA, $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ IBA i bez GA₃ uglavnom su se razvijali ve i listi i pri vrhu izdanaka. No ako je na eksplantatu bilo više od deset izdanaka, listi i su bili nešto manji i jednoliko raspore eni duž izdanka (slika 13).

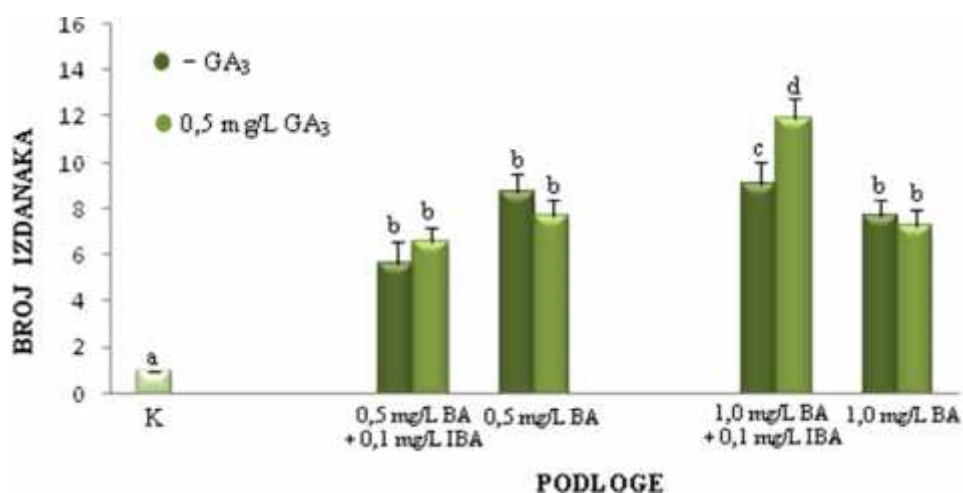


Slika 13. Razlike u veličini listova: veći i listovi pri vrhu eksplantata s manjim brojem izdanaka (A); sitniji i jednolikije raspoređeni listovi na eksplantatima s većim brojem izdanaka (B).

4.2.3. TREĆA SUPKULTURA

Usporedbu i rezultate druge i treće supkulture (slike 12 i 14) vidljivo je da se najveći broj izdanaka na podlogama bez IBA razvio ako u podlogu nije dodana giberelinska kiselina, a sadržavala je BA u nižoj koncentraciji ($0,5 \text{ mg dm}^{-3}$). Ukoliko je u podlozi bilo IBA, najproduktivnija je bila podloga koja je sadržavala i GA_3 , te višu koncentraciju BA ($1,0 \text{ mg dm}^{-3}$).

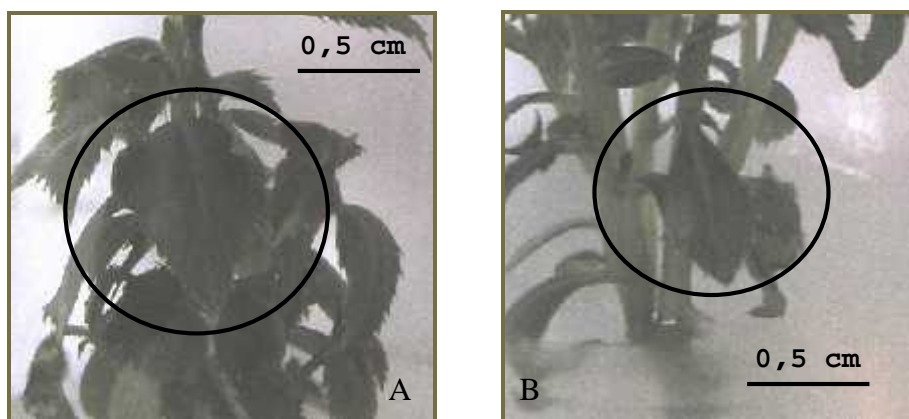
MS hranjive podloge s $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ BA te bez indol-3-maslačne kiseline uglavnom su pogodovale stvaranju većih izdanaka. Prosječna visina izdanaka na tim podlogama iznosila je $1,5 \text{ cm}$, dok je na podlogama s višom koncentracijom citokinina ($1,0 \text{ mg dm}^{-3}$) ona iznosila 1 cm . Nadalje, listovi na podlogama s $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ BA površinom su otprilike dvostruko veći od onih na podlogama koje su sadržavale $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ BA (slika 15).



Slika 14. Srednja vrijednost broja izdanaka, na MS podlogama s različitim koncentracijama regulatora rasta, treće supkulture. Rezultati označeni različitim slovima statistički se razlikuju ($P < 0,05$).

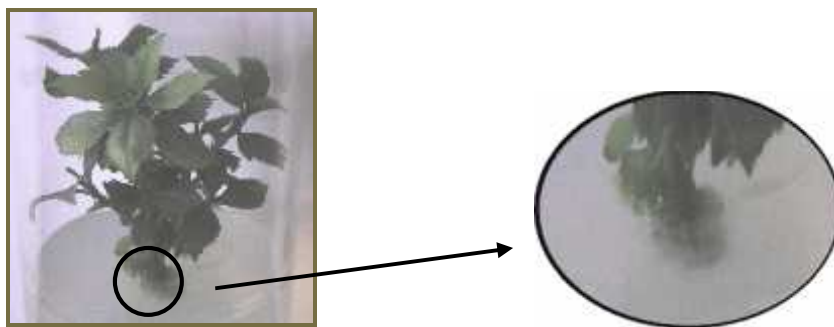
Ukoliko se u podloge s $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ BA doda giberelinska kiselina, izdanci su podjednako visoki, a listi i jednoliko raspoređeni duž izdanka. Na ostalim podlogama veličina izdanka je značajnije odstupala od prosjeka. Eksplantati nasačeni na podlogu bez IBA pogodovali su stvaranju kraćih izdanaka, za razliku od eksplantata nasačeni na podloge s IBA. Listi i na izdancima eksplantata nasačeni na podlogu bez giberelinske kiseline bili su gušći i pri vrhu izdanka.

Od eksplantata koji su rasli na podlozi s $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ IBA, najviša stopa multiplikacije uočena je na podlogama u kojima je sastavu također bio $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ BA i $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ GA₃ (slika 14), tj. ona koja sadrži sva tri regulatora rasta u najvišim koncentracijama korištenim u istraživanju. Iako je ova podloga pogodovala nastanku najvećeg broja prilika, ujednačenih izdanaka, ti izdanci su bili manji te slabije razvijeni.



Slika 15. Prosječna veličina listova na podlozi bez IBA u trećoj supkulturi crnoplodne aronije. Slika A prikazuje listove na podlozi s $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ BA, a slika B na podlozi s $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ BA.

Pojava kalusa i u ovoj supkulturi zanemariva je; razvio se na svega 9,3% eksplantata. Od 9 eksplantata s kalusom, njih 8 (88,9%) je razvijeno na podlogama s auksinom. U eksplantata s kalusom glavna os izdanaka bila je prilikom zadebljana pri dnu, te robusnija od ostalih izdanaka (slika 16). Budući da su neki eksplantati s kalusom razvili iznadprosječan broj izdanaka, proizlazi da stvaranje kalusa nije značajno utjecalo na stopu multiplikacije crnoplodne aronije.



Slika 16. Kalus razvijen na bazi izdanka crnoplodne aronije u tre ojoj supkulturi na podlozi s IBA.

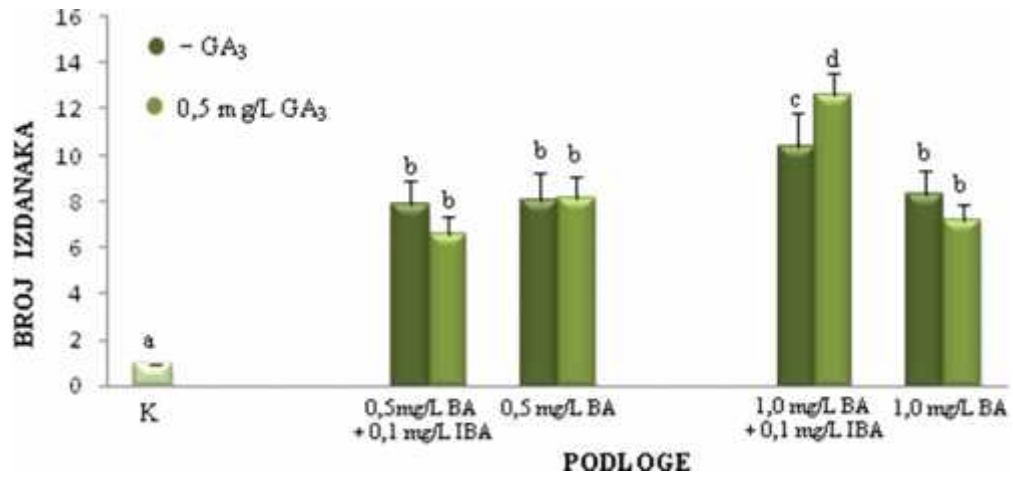
4.2.4. PROSJE NA STOPA UMNAŽANJA KROZ TRI SUPKULTURE

Kontrolni izdanci aronije uzgajani su na MS podlozi bez dodatka regulatora rasta. Na tim podlogama primije en je izostanak multiplikacije, no izdanci su bili redovito ve i i bolje razvijeni od onih na podlogama s dodatkom regulatora rasta. Isto tako, kontrolni izdanci imali su ve e listove (slika 17). Osim toga, na kontrolnim je izdancima došlo do razvoja korijenja, što nije bio slu aj s izdancima razvijenim na podlogama koje su sadržavale regulatore rasta.

Uzimaju i u obzir sve podloge u svim supkulturama, multiplikacija je bila najuspješnija na podlozi koja je sadržavala maksimalne koli ine istraživanih regulatora rasta ($1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ BA, $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ GA₃, $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ IBA; slika 18). Tako er je važno uo iti da se rezultati umnažanja na podlogama bez auksina IBA me usobno statisti ki nisu razlikovali.



Slika 17. Snažan izdanak s velikim gusto raspore enim listovima prili no nazubljenima na rubu i korijenom na kontrolnom mediju.



Slika 18. Prosje na vrijednost broja izdanaka kroz tri supkulture na MS podlogama s razli itim koncentracijama regulatora rasta. Rezultati ozna eni razli itim slovima statisti ki se razlikuju ($P < 0,05$).

V. RASPRAVA

Cilj istraživanja provedenog u sklopu ovog diplomskog rada bio je utvrditi optimalne uvjete uvođenja, te uzgoja crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* Michx.) u kulturi *in vitro*. Budući da su biljne stanice totipotentne, nasačivanjem dijela biljke na specifičnu hranjivu podlogu može se postići i regeneracija cijele biljke. U praksi je takav postupak poznat pod nazivom kultura biljnog tkiva (Jelaska, 1994). Ukoliko se tako uzgojeni dijelovi biljke podvrgnu daljnjim istraživanjima zakorjenjivanja i aklimatizacije, mikropropagacija može imati značajnu ulogu u komercijalnoj proizvodnji voćnih i povrtnih vrsta (Pintarić, 2008).

Istraživanja provedena još sredinom druge polovice XX. stoljeća pokazala su da je za brojne vrste porodice *Rosaceae* najpogodnija hranjiva podloga MS s punom koncentracijom makroelemenata uz dodatak 3% saharoze i 0,8% agara (Walkey i Pink, 1988).

U sklopu preliminarnih istraživanja uspoređena je stopa multiplikacije na MS hranjivoj podlozi s punom (MS) i polovinom koncentracijom makroelemenata ($\frac{1}{2}$ MS). Iako nije ustanovljena značajnija razlika u stopi multiplikacije između u eksplantata nasačivenih na MS i $\frac{1}{2}$ MS podlogu, oni na podlozi s punom koncentracijom makroelemenata bili su snažniji. Stoga je istraživanje multiplikacije crnoplodne aronije nastavljeno na podlozi s punom koncentracijom makroelemenata. Ipak, brojna istraživanja provedena na vrstama koje rastu na siromašnim tlima pokazala su uspješnije umnažanje na podlogama s polovinom koncentracijom makroelemenata (Pevalek-Kozlina i sur., 1997 i 1999).

Do značajnije razlike na podlozi $\frac{1}{2}$ MS došlo je u razvoju korijena. Naime polovi na koncentracija makroelemenata pogodovala je boljem razvoju korijena, iako su izdanci na tim podlogama bili manji i neugledniji (Krnjević, 2009).

Tijekom tri supkulture primijetila sam smanjenje broja razvijenih izdanaka. Slično su pokazali rezultati umnažanja vrste *Degenia velebitica* u uvjetima *in vitro* (Pevalek-Kozlina i sur., 1999). Postupni porast broja izdanaka tijekom supkultiviranja opažen je u istraživanjima različitih kultivara ruže (Sauer i sur., 1985), vrste *Centaurea ragusina* (Pevalek-Kozlina, 1998), te *Campanula isophylla* (Brandt, 1992).

Prosječna stopa umnažanja vrste *Aronia melanocarpa* bila je veća za 31% ukoliko je u podlozi bila prisutna viša koncentracija BA ($1,0 \text{ mg dm}^{-3}$). Uspješniju multiplikaciju na podlogama s višom koncentracijom 6-benzilaminopurina u svojim istraživanjima potvrdili su Pevalek-Kozlina i sur. za vrste *Fibigia triquetra* (1997) te *Degenia velebitica* (1999).

Ako se u podlozi nalazio i IBA umnažanje je bilo uspješnije čak za 46%. Rezultati ukazuju na mogućnost da auksin ima značajniji utjecaj na djelovanje ostalih regulatora rasta u podlozi. S druge pak strane takav rezultat može ukazati na utjecaj nekog drugog regulatora rasta na IBA. Ako je u podlozi citokinin BA prisutan u koncentraciji od $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$, jači je

utjecaj i auksina IBA na multiplikaciju. Ipak nema dovoljno podataka da bi se takvo što sa sigurnoš u tvrdilo.

Rezultat da su eksplantati na podlozi s $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ BA, $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ GA₃, te $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ IBA, stvarali manje izdanaka nego oni razvijeni na podlozi s istom koli inom BA i GA₃ ali bez IBA može se objasniti fiziološkim u incima citokinina i auksina. Citokinini poti u rast bo nih pupova, dok su auksini važni za apikalnu dominaciju. Budu i da je citokinin BA bio prisutan u nižoj koncentraciji ($0,5 \text{ mg dm}^{-3}$), tako er prisutan auksin IBA djelomi no je inhibirao njegovo djelovanje. S druge pak strane, na podlozi bez auksina citokinin je potaknuo dodatni rast bo nih izdanaka što je u kona nici rezultiralo ve om stopom multiplikacije.

Podloge koje su sadržavale sva tri regulatora rasta u višim koncentracijama ($1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ BA, $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ IBA, $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ GA₃) pogodovale su stvaranju najve eg broja izdanaka. Petrovi i Ja imovi -Plavši (1992) najbolje rezultate mikropropagacije vrste *Aronia melanocarpa* ostvarile su na MS podlozi sa sva tri regulatora rasta (BA, IBA i GA₃). Ipak treba istaknuti da su istraživanja provele s pet puta nižom koncentracijom giberelinske kiseline ($0,1 \text{ mg dm}^{-3}$) u odnosu na naše istraživanje.

Kane i sur. (1991) istražili su multiplikaciju crvenoplodne aronije (*Aronia arbutifolia* (L.) Pers.) na podlozi WPM (Woody Plant Medium) koja je sadržavala citokinin BA, auksin NAA te giberelin GA₃. Pri nižoj koncentraciji BA ($0,5 \text{ mg dm}^{-3}$) stopa multiplikacije crvenoplodne aronije na podlozi WPM bila je sli na stopi multiplikacije crnoplodne aronije koju smo zabilježili na podlozi MS (6,90 izdanaka po eksplantatu razvilo se na podlozi WPM; 6,62 na MS podlozi). Multiplikacija na podlozi MS s dodatkom $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ BA bila je dvostuko uspješnija od one izmjerene na podlozi WPM (6,20 izdanaka po eksplantatu razvilo se na WPM; 12,62 na MS). S druge pak strane, viša koncentracija BA ($1,0 \text{ mg dm}^{-3}$) pogodovala je stvaranju dužih izdanaka crvenoplodne aronije na podlozi WPM (prosje na dužina izdanaka na podlozi WPM iznosila je 1,93 cm; 1,50 cm na podlozi MS), dok je dodatak BA od $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ pogodovao stvaranju duljih izdanaka crnoplodne aronije na podlozi MS (2,00 cm na MS; 1,09 cm na WPM). Prema tome, može se izvesti zaklju ak da viša koncentracija citokinina BA povoljno utje e na multiplikaciju na podlozi MS, dok na podlozi WPM povoljno utje e na dužinu izdanka aronije.

Rezultati provedenog istraživanja ukazuju na uspješnost umnažanja vrste *Aronia melanocarpa* u uvjetima *in vitro*. S obzirom na nezahtjevnost ove vrste, nastavak istraživanja usmjerila bih na odre ivanje minimalnih koli ina makro- i mikroelemenata te regulatora rasta dovoljnih za uspješnu multiplikaciju crnoplodne aronije. To bi omogulo isplativiju komercijalnu proizvodnju ove iznimno nutritivno vrijedne vo ke.

VI. ZAKLJUČAK

Istraživanja provedena u okviru ovog diplomskog rada pokazuju da se vrsta *Aronia melanocarpa* može uspješno umnožavati metodom bo nih pupova u uvjetima *in vitro*. Na temelju dobivenih rezultata može se izvesti nekoliko zaključaka.

Površinska sterilizacija odsječaka granica aronije uspješno je provedena s 5%-tnim Izosanom® i 6%-tnom otopinom vodikovog peroksida.

Najpogodnija hranjiva podloga bila je podloga MS s punom koncentracijom makroelemenata, a stopa umnažanja ovisila je o koncentraciji regulatora rasta (BA, GA₃ i IBA) u podlozi. Najbolji rezultati dobiveni su sa sljedećim koncentracijama regulatora rasta: 1,0 mg dm⁻³ BA, 0,5 mg dm⁻³ GA₃, te 0,1 mg dm⁻³ IBA.

Razvoj kalusa bio je minimalan, ali ipak uočljiv na podlozi s IBA. Također su se na podlozi s indol-3-maslačnom kiselinom počeli razvijati korjenci.

Ukupan broj izdanaka smanjuje se sa svakom sljedećom supkulturom. Na podlogama s 0,5 mg dm⁻³ BA izdanci su bili duži nego na podlozi s 1,0 mg dm⁻³ BA.

Djelovanje auksina ovisi o prisutnosti ostalih regulatora rasta u podlozi (BA i GA₃). Kad je u podlozi bio prisutan 1,0 mg dm⁻³ BA, multiplikacija je bila uspješnija ako je bio prisutan i IBA. Promatra li se uspješnost multiplikacije s obzirom na prisustvo giberelina, može se zaključiti da GA₃ doprinosi stopi multiplikacije ukoliko je u podlozi prisutan i IBA.

VII. LITERATURA

Boxus, P.H., Terzi, J.M. (1987): Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation schemes. *Acta Hortic.* 212, 91 - 93

Brandt, K. (1992): Micropropagation of *Campanula isophylla* Moretti. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 29, 31 - 36

Cassells, A.C. (1986): Production of healthy plants. Proceedings of the Institute of Horticulture Symposium: Micropropagation in Horticulture Univ. Nottingham Trent Print Unit, Aldreson, PG i Dulforce, WM (Ur.), Nottingham, 53 - 71

Cassells, A.C., Harmey, M.A., Carney B.F., McCartey, E., McHugh, A. (1988): Problems posed by cultivable endophytes in the establishment of axenic cultures of *Pelargonium domesticum*: the use of *Xanthomonas pelargonii*-specific ELISA, DNA probes and cultures indexing of antibiotic treated and untreated donor plants. *Acta Hortic.* 225, 153 - 161

rnjevi , S. (2009) Zakorjenjivanje i aklimatizacija crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* Michx.) razmnožene u uvjetima *in vitro*. Diplomski rad, Prirodoslovno-matemati ki fakultet Sveu ilišta u Zagrebu, Zagreb

Deimling, G., Mollers, C. (1988): Aseptic handling of potato material during protoplast isolation and regeneration. *Acta Hortic.* 225, 209 - 215

Filipovi , I., Lipanovi , S. (1995): Op a i anorganska kemija, Klor. Školska knjiga Zagreb, 667 - 1107

Fisse J., Batalle A., Pera J. (1987): Endogenous bacteria elimination in ornamental plants. *Acta Hortic.* 212, 87 - 90

George, E.F., Sherrington, P.D. (1984): Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd., Eversley, Basinstoke, Herts., str. 88 - 93

Jakobek, L., Šeruga, M., Medvidovi -Kosanovi , M., Novak, I. (2007): Antioxidant Activity and Polyphenols of Aronia in Comparison to other Berry Species. *Agric. Conspec. Sci.* 72, 301 - 306

Jelaska, S. (1994): Kultura biljnih stanica i tkiva. Školska knjiga, Zagreb, str. 94 - 142

Jeppsson, N. (2000): The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) cv. 'Viking'. Sci. Hort. 83, 127 - 137

Kane, M.E., Dehgan, B., Sheehan, T.J. (1991): *In vitro* propagation of Florida native plants: *Aronia arbutifolia*. Proc. Fla. State Hort. Soc. 104, 287 - 290

Knauss, J.F. (1976): A partial tissue culture method of pathogen-free propagation of selected ferns from spores. Proc. Fla. State Hort. Soc. 89, 363-365

Leifert, C., Waites, W.M. (1990): Contaminants of plant tissue cultures. Newsletter IAPTC 60, 1 - 13

Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473 - 497

Petrovi, D.M., Jamić, M.M. (1992): *Aronia melanocarpa* and propagation *in vitro*. In vitro culture, XXIIIrd International Horticultural Congress, Florence, Italy, 30. August 1990. IHS Acta Hort. 300, 133 - 135

Pevalek-Kozlina, B. (1998): *In vitro* propagation of *Centaurea ragusina* L., Croatian endemic species. Acta Biol. Cracow. 40, 21 - 24

Pevalek-Kozlina, B. (2002): Fiziologija bilja. Profil International, Zagreb, str. 315 - 377

Pevalek-Kozlina, B., Kostović, V. and Slade, D. (1997): *In vitro* propagation of *Fibigia triquetra* (DC.) Boiss., a rare stenoendemic species. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 51, 141 - 143

Pevalek-Kozlina, B., Pavlica M. and Vujević, M. (1999): Micropropagation of *Degenia velebitica* (Deg.) Hay., a Croatian endemic plant species. Phytion 39, 293 - 296

Pintari , B. (2008): Mikropropagacija bijele topole (*Populus alba* L.). Šumarski list. 7 - 8., 343 - 354

Ruži , .V. (1993): *In vitro* rooting and subsequent growth of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) plants *ex vitro*. J. Fruit Ornam. Plant Res. 1, 1 - 8

Sauer, A., Walther, F., Preil, W. (1985): Different suitability for *in vitro* propagation of rose cultivars. Gartenbaumwissenschaft 50, 133 - 138

Walkey, D.G.A., Pink, D.A.C. (1988): Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) and broccoli (*B. oleracea* var. *italica*). U: Bajaj, YPS. (ur.) Biotechnology in Agriculture and Forestry 6, Crops, Springer-Verlag, Berlin, str. 252 - 276

Internet stranice:

www.aronija.com.hr

www.borovnicaunas.hr

www.greengarden.com

www.vinogradarstvo.com

www.wikipedia.com (strukturne formule spojeva)