

Razmnožavanje biljke miskantus postupkom mikropropagacije

Tomečak, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Polytechnic of Međimurje in Čakovec / Međimursko veleučilište u Čakovcu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:110:597993>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

[Polytechnic of Međimurje in Čakovec Repository - Polytechnic of Međimurje Undergraduate and Graduate Theses Repository](#)



MEĐIMURSKO VELEUČILIŠTE U ČAKOVCU
ODRŽIVI RAZVOJ

TEA TOMEČAK

**RAZMNOŽAVANJE BILJKE MISKANTUS
POSTUPKOM MIKROPROPAGACIJE**

ZAVRŠNI RAD

Čakovec, 2022.

MEDIMURSKO VELEUČILIŠTE U ČAKOVCU

ODRŽIVI RAZVOJ

TEA TOMEČAK

**RAZMNOŽAVANJE BILJKE MISCANTUS
POSTUPKOM MIKROPROPAGACIJE
REPRODUCTION OF MISCANTHUS PLANT BY
MICROPROPAGATION**

ZAVRŠNI RAD

Mentor:

dr. sc. Silvija Zeman, v. pred.

Čakovec, 2022.

MEĐIMURSKO VELEUČILIŠTE U ČAKOVCU
ODBOR ZA ZAVRŠNI RAD

Čakovec, 28. veljače 2022.

Država: Republika Hrvatska
Predmet: Održivo gospodarenje tlom

ZAVRŠNI ZADATAK br. 2021-OD-R-102

Pristupnik: **Tea Tomečak (0125164047)**
Studij: redovni preddiplomski stručni studij Održivi razvoj
Smjer: Ekoinženjerstvo
Zadatak: **Razmnožavanje biljke miskantus postupkom mikropropagacije**

Opis zadatka:

SAŽETAK

Cilj ovoga završnog rada je razviti sustav mikropropagacije za biljku miskantus. Miskantus je višegodišnja trava podrijetlom iz istočne Azije. Miskantus se uglavnom proširio u Europi i Sjevernoj Americi kao rezultat njegove upotrebe kao ukrasne trave. Međutim, uzgoj miskantusa vrlo je skup pa je područje uzgoja u Europi još uvijek malo. Razmnožavanje miskantusa provodi se vegetativno, podzemnim rizomima, ili mladim biljkama uzgojenim kulturom tkiva (mikropropagacijom).

Jedan alternativni način razmnožavanja je mikropropagacija, koja je vrlo učinkovita zbog svoje visoke stope umnožavanja te ima dodatnu prednost jer može spriječiti prijenos bolesti. Ova metoda je najskuplji način razmnožavanja miskantusa pa se stoga uglavnom koristi za znanstvena ispitivanja. Mikropropagacija je metoda vegetativnog razmnožavanja na umjetno stvorenim hranjivim podlogama u kontroliranim uvjetima rasta i *in vitro* sterilnim uvjetima. Ovim postupkom osigurava se vrlo brz proces dobivanja velikog broja biljaka koje su identične po genetskom potencijalu, rastu i razvoju vrste. Ovaj završni rad bit će strukturiran na način da ukaže na važnost proizvodnje miskantusa, na njegove karakteristike, na dosadašnje spoznaje o toj biljci, na dostignuća, budućnost i perspektivu miskantusa *in vitro* tehnikom.

Zadatak uručen pristupniku: 28. veljače 2022.

Rok za predaju rada: 20. rujna 2022.

Mentor:

Predsjednik
povjerenstva za
završni ispit:



dr. sc. Silvijana Zeman, v. pred.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Silviji Zeman na pomoći i vodstvu pri izradi ovog završnog rada, te za strpljenje koje je imala za moje brojne upite. Također zahvaljujem analitičarkama, iz laboratorija Biokemije okoliša, Andrei Vargi i Eleni Mikolaj na susretljivosti i ustupljenim materijalima za pisanje ovog rada.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojim prijateljima koji su bez kojih moje studiranje ne bi prošlo ovako lako i zabavno.

Najveću zaslugu za sve što sam postigla pripisujem svojim roditeljima Milanu i Sanji, bratu Filipu i dečku Franji, kojima posvećujem ovaj završni rad, oni su uvijek bili tu za mene tokom dobrih i loših trenutaka i bez njih ovo što sam do sad postigla ne bi bilo moguće. Hvala vam što ste mi pružili priliku da ispunim svoj san iz djetinjstva. Naravno, hvala i svim ostalim članovima uže i šire obitelji. Uz pruženu ljubav sa obiteljske strane sve je moguće ostvariti, oni su mi pokazani da je to uistinu tako jer su uvijek bili tu da mi pruže pomoć i podršku. Zbog toga je završetak mog školovanja najmanje što im mogu dati, a hvala jedino što mogu reći.

SAŽETAK

Cilj ovoga završnog rada je opisati različite sustave mikropropagacije za biljku miskantus. Miskantus je višegodišnja trava podrijetlom iz istočne Azije. Miskantus se uglavnom proširio u Europi i Sjevernoj Americi kao rezultat njegove upotrebe kao ukrasne trave. Međutim, uzgoj miskantusa vrlo je skup pa je područje njegovog uzgoja u Europi još uvijek malo. Razmnožavanje miskantusa provodi se vegetativno, podzemnim rizomima, ili mladim biljkama uzgojenim kulturom tkiva (mikropropagacijom). Jedan alternativni način razmnožavanja je mikropropagacija, koja je vrlo učinkovita zbog svoje visoke stope umnožavanja te ima dodatnu prednost što može spriječiti prijenos bolesti. Ova metoda je najskuplji način razmnožavanja miskantusa pa se stoga uglavnom koristi za znanstvena ispitivanja. Mikropropagacija je metoda vegetativnog razmnožavanja na umjetno stvorenim hranjivim podlogama u kontroliranim uvjetima rasta i in vitro sterilnim uvjetima. Ovim postupkom osigurava se vrlo brz proces dobivanja velikog broja biljaka koje su identične po genetskom potencijalu, rastu i razvoju vrste. Ovaj završni rad bit će strukturiran na način da ukaže na važnost proizvodnje miskantusa mikropropagacijom, na njegove karakteristike, na dosadašnje spoznaje o toj biljci, na dostignuća, budućnost i perspektivu mikropropagacije miskantusa in vitro tehnikom.

Ključne riječi: *miskantus, biljka, razmnožavanje, mikropropagacija, in vitro, sterilni uvjeti, reprodukcija*

ABSTRACT

The aim of this final paper is to develop and describe different micropropagation systems for the Miscanthus plant. Miscanthus is a perennial herb native to East Asia. Miscanthus has spread mainly in Europe and North America as a result of its use as an ornamental herb. However, the cultivation of Miscanthus is very expensive, so its area of cultivation in Europe is still small. Propagation of Miscanthus is carried out vegetatively, by underground rhizomes, or young plants grown by tissue culture (micropropagation). One alternative method of propagation is micropropagation, which is very effective due to its high multiplication rate and has the added advantage of being able to prevent disease transmission. This method is the most expensive method of propagating Miscanthus and is therefore mainly used for scientific research. Micropropagation is a method of vegetative propagation on artificially created nutrient media under controlled growth conditions and in vitro sterile conditions. This procedure ensures a very fast process of obtaining a large number of plants that are identical in genetic potential, growth and development of the species. This final paper will be structured in such a way as to point out the importance of Miscanthus production by micropropagation, its characteristics and current knowledge about this plant, achievements, future and perspective of Miscanthus micropropagation by in vitro technique.

Keywords: *Miscanthus, plant, propagation, micropropagation, in vitro, sterile conditions, reproduction*

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 8 |
| 2. MISKANTUS | 10 |
| 2.1. Taksonomija miskantusa | 12 |
| 2.2. Klimatski uvjeti | 12 |
| 2.3. Zahtjevi prema tlu | 14 |
| 2.3. Miskantus kao C4 biljka i učinkovitost korištenja resursa | 14 |
| 2.4. Tolerancija na abiotičke stresove | 15 |
| 2.5. Ciljevi uzgoja | 16 |
| 3. GLOBALNA PROIZVODNJA I UPOTREBA MISKANTUSA | 18 |
| 3.1. Neenergetska mogućnost korištenja miskantusa | 19 |
| 3.1.1. Upotreba miskantusa kao materijala | 19 |
| 3.1.2. Miskantus kao prostirka za životinje | 21 |
| 3.2. Energetska mogućnost korištenja miskantusa | 22 |
| 3.2.1. Izgaranje miskantusa | 23 |
| 3.2.2. Bioplin | 24 |
| 3.2.3. Tekuća biogoriva i biokemikalije | 25 |
| 3.3. Troškovi proizvodnje biomase | 26 |
| 3.4. Obnova zemljišta (fitoremedijacija) | 27 |
| 4. MIKROPROPAGACIJA | 28 |
| 4.1. Vrste mikropropagacije miskantusa | 29 |
| 4.2. Faze mikropropagacije | 30 |
| 4.3. Tehnički aspekti | 32 |
| 4.4. Prednosti i nedostaci mikropropagacije | 34 |
| 4.4.1. Prednosti | 34 |
| 4.4.2. Nedostaci | 35 |

| | |
|---|----|
| 5. PREGLED KULTURE STUDIJA <i>IN VITRO</i> | 36 |
| 6. MATERIJALI I METODE | 36 |
| 6.1. Morfogeneza <i>Miscanthus x giganteus in vitro</i> [22] | 36 |
| 6.2. Regeneracija biljaka <i>Miscanthus x giganteus</i>: učinak tipova kalusa, starosti i načina uzgoja na sposobnost regeneracije [23] | 37 |
| 6.3. Učinkovit i jednostavan <i>in vitro</i> sustav regeneracije <i>Miscanthus sinensis</i>, <i>M. x giganteus</i> i <i>M. sacchariflorus</i> za sadnju i biotehnološke svrhe [24] | 38 |
| 7. REZULTATI I RASPRAVA | 39 |
| 7.1. Morfogeneza <i>Miscanthus x giganteus in vitro</i> [22] | 39 |
| 7.2. Regeneracija biljaka <i>Miscanthus giganteus</i>: učinak tipova kalusa, starosti i načina uzgoja na sposobnost regeneracije [23] | 43 |
| 7.3. Učinkovit i jednostavan <i>in vitro</i> sustav regeneracije <i>Miscanthus sinensis</i>, <i>M. x giganteus</i> i <i>M. sacchariflorus</i> za sadnju i biotehnološke svrhe [24] | 47 |
| 8. ZAKLJUČAK | 52 |
| 9. LITERATURA | 53 |
| 10. POPIS SLIKA | 56 |

1. UVOD

U današnje vrijeme susrećemo se s različitim izazovima kao što su energetska kriza, zabrinutost za sigurnost hrane i degradacija te onečišćenje okoliša. Sve navedeno dovodi do nužnosti pronalaska zamjene za fosilna goriva čija upotreba dovodi do stvaranja velikih količina ugljikovog dioksida i negativnog utjecaja na okoliš te do povećane stope onečišćenja. Biogoriva na bazi biljaka mogu dovesti do ukupnog smanjenja emisija stakleničkih plinova kroz fiksaciju atmosferskog ugljika u korisnu biomasu biljke [1]. Kandidati za nove bioenergetske usjeve trebaju biti vrlo visoko produktivni, sposobni rasti na marginalnom zemljištu (zemljištu male poljoprivredne vrijednosti) i zahtijevati niske unose gnojiva i pesticida. Intenzivni uzgoj energetskih biljaka u Hrvatskoj nema dugu tradiciju. Većina energetskih biljaka je malo poznata i nedovoljno istražena.

Nekoliko vrsta trava iz roda *miskantus* smatra se izvanrednim kandidatima za održivu proizvodnju biomase koja bi omogućila proizvodnju obnovljivih izvora energije. Vrste iz roda *miskantus* su višegodišnje divovske trave iz istočne Azije, od kojih su neke unesene u Europu iz Japana 1935. godine. *Miskantus* ima relativno nisku emisiju CO₂, prilagođen je raznim vrstima tala, a pokazuje dobru otpornost na sušu i slanost. Zbog svoje fotosinteze tipa C4 i visoke učinkovitosti korištenja voda, *miskantus* ima tendenciju da daje vrlo veliki potencijal u proizvodnji biomase, što ga čini vrlo pogodnim i perspektivnim za proizvodnju biogoriva i vlakana u Europi. Važno je naglasiti kako se smatra ekološki prihvatljivim proizvođačem biomase, biogoriva¹, lignina² i lignoceluloze.

Razmnožavanje *miskantusa* provodi se vegetativno, podzemnim rizomima, ili mladim biljkama uzgojenim kulturom tkiva (mikropropagacijom). Biljka se obično razmnožava diobom rizoma, ali njihova je proizvodnja vrlo spora i uspjeh uspostavljanja novih usjeva je pod snažnim utjecajem starosti matične biljke. Prve radove usmjerene na mikropropagaciju *miskantusa* putem kalusa³ iz nezrelog cvata objavili su Holme i

¹ Biogoriva su goriva koja se dobivaju preradom biomase. Njihova energija je dobivena fiksacijom ugljika, tj. redukcijom ugljika iz zraka u organske spojeve.

² Lignin je neugljikohidratni polifenolni polimer, glavni sastojak drva, koji poput plastike ili cementa povezuje celulozna vlakna u vrlo čvrstu izvanstaničnu strukturu.

³ Kalus je masa parenhinskog tkiva koja se nalazi uz ranu nastalu pri mehaničkim povredama bilo kojeg dijela biljke.

Petersen (1996.) te Lewandowski (1997.). U novije vrijeme metoda mikropropagacije sve se više koristi, no ta je metoda najskuplji način razmnožavanja miskantusa pa zato još uvijek prevladava umnožavanje rizomima. Trenutačno nema dobro utvrđene ili preporučene metode mikropropagacije različitih vrsta miskantusa koja bi bila prikladna za komercijalnu proizvodnju, ali se smatra da će u bliskoj budućnosti trava iz roda miskantus igrati važnu ulogu u održivoj poljoprivredi. Nedavne projekcije predviđaju da će miskantus zadovoljiti 5 % globalnih energetske potrebe u 2090-ima. Jedanaest milijuna kilometara kvadratnih marginalnog zemljišta u EU smatra se prikladnim za uzgoj miskantusa zbog visoke tolerancije na abiotičke stresove, kao i učinkovitosti korištenja vode C4 ciklusa biljke.

2. MISKANTUS

Prema članku 7. Pravilnika o popisu biljnih vrsta za osnivanje drvenastih kultura kratkih ophodnji te načinu i uvjetima pod kojima se mogu uzgajati (NN 16/2019; u daljnjem tekstu: Pravilnik) [2] rod *Miscanthus* pripada porodici trava (Poaceae). Miskantus je višegodišnja, drvenasta, rizomatska⁴ trava podrijetlom iz istočne Azije. Spada u grupu C4 biljaka i bogata je ligninom i lignoceluloznim vlaknima. Miskantus je triploidna višegodišnja biljka, s debelim i jakim rizomima. Stabljika je visoka 2,5 – 3,5 m. Lisna plojka je duža od 50 cm, a široka je oko 3 cm. Cvat je oko 30 cm dug, ali ne proizvodi sjeme. Vrijeme cvatnje je između rujna i studenog. Uspravna stabljika je tanka i obično se ne grana. Čvrstom srčikom ispunjene stabljike promjera su 10 mm i u Europi mogu doseći visinu od nešto preko 2 m u 1. godini pa do 4 m svake sljedeće godine. Duljina ophodnje te način i uvjete pod kojima se mogu uzgajati kulture svake pojedine vrste iz članka 4. ovoga Pravilnika utvrđeni su u Prilogu II. ovoga Pravilnika.

Miskantus je prvi u Europu iz Japana unio danski kolekcionar bilja Axel Olsen. Miskantus se danas u Europi smatra jednom od vodećih višegodišnjih energetskeg trava zbog svoga velikog potencijala prinosa suhe tvari i sposobnosti rasta u širokom rasponu klimatskih uvjeta, od južne do sjeverne Europe [3]. U njegovim staničnim stijenkama nalazi se veliki udio holoceluloze⁵, koju čine celuloza i hemiceluloza⁶, što ga čini višenamjenskom sirovinom za pretvorbu u širok raspon materijala i omogućava njegovo korištenje u brojnim sustavima proizvodnje energije [4]. Trenutačno se ispituju i ocjenjuju različite hibridne vrste miskantusa na različitim klimatskim područjima i tlima, uključujući rubna zemljišta koja su manje pogodna za proizvodnju hrane, s krajnjom ciljanom opskrbom kvalitetnom biomasom prikladnom za različite namjene.

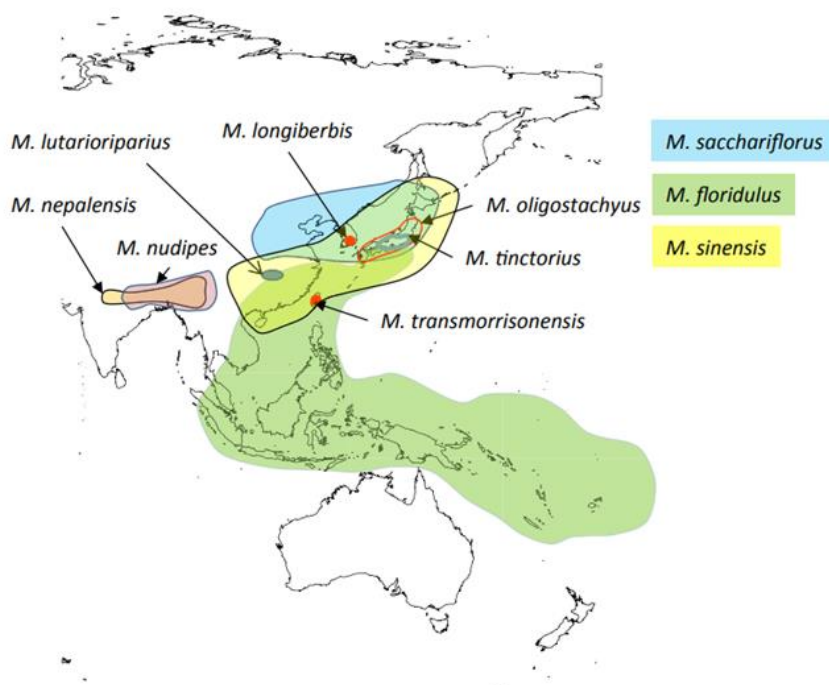
Domovina Miskantusa su u velikoj mjeri Japan, Mandžurija, Koreja, Tajland i istočna obala SAD-a. U prirodnim uvjetima ova biljka raste do visine od 6 metara, a promjer stabljike može biti do 6 centimetara. Nakon sadnje jedna kultura može se sakupljati godišnje, 15 ili više godina, a vegetacija može potrajati do 30 godina. Početkom V.

⁴ Rizom je modificirana podzemna stabljika kod nekih biljaka koja se nalazi ispod zemlje i ima korijenje.

⁵ Svi ugljikohidrati koji se nalaze u drvnjoj supstanci, a koji se sastoje od celuloze i hemiceluloze, nazivaju se zajedničkim imenom holoceluloza.

⁶ Hemiceluloza je heterogena skupina dugolančastih polisaharida koji se razlikuju od celuloze.

stoljeća miskantus se uzgajao samo u Kini kao erozijska kultura [5]. U Europi se u XVI. stoljeću smatrao samo ornamentalnom biljkom. Zemljopisna distribucija miskantusa u području njegovog podrijetla, istočnoj Aziji, ukazuje da *Miscanthus sinensis* i *Miscanthus sacchariflorus* imaju potencijal rasta u različitim klimatskim uvjetima, dok je *Miscanthus floridulus* ograničen na geografske širine ispod 30° N [k4] kao što je prikazano na slici 1. Smatra se da je prirodni hibrid *Miscanthus x giganteus* nastao iz *M. sinensis* i *M. sacchariflorus* [4]. Iako se ova prirodna hibridizacija dogodila više puta, danas se gotovo sva komercijalna proizvodnja miskantusa temelji na jednom genotipu prikupljenom u Japanu 1935. godine.



Slika 1: Zemljopisna rasprostranjenost glavnih vrsta miskantusa [4]

2.1. Taksonomija miskantusa

Miskantus pripada istom plemenu trava kao i kukuruz, sirak i šećerna trska: Andropogoneae. Na usku povezanost miskantusa sa šećernom trskom i sirkom ukazuje njegova morfološka i molekularna karakterizacija [5]. Za razliku od šećerne trske, kukuruza i drugih C4 biljaka, miskantus može rasti u hladnim klimatskim uvjetima. Različite studije izvještavaju o različitom broju vrsta za rod miskantus u rasponu od 14 do 23 vrste [4].

Miscanthus sensu stricto (ss, u strogom smislu) uključuje samo one vrste s osnovnim brojem kromosoma 19. Međunarodni indeks biljnih imena (International Plant Names Index) navodi preko 60 vrsta, ali samo 11 - 12 vrsta može se prepoznati u *Miscanthus s.s.* Poznato je da dolazi do hibridizacije unutar roda pa je nekoliko hibrida identificirano te je dobilo svoje ime unatoč nedostatku prepreka za razmnožavanje.

Miskantus je klasificiran u pretežno tropske trave plemena Andropogoneae i podplemena Saccharinae [3]. Saccharinae uključuje rod šećerne trske *Saccharum L.* i nekoliko manje poznatih rodova. Miskantus vrste su neuobičajene među Andropogoneae jer imaju dvospolne uparene klasove, oba s hermafroditnim cvjetovima (slika 1). Druge Andropogoneae imaju uparene klasove, ali s izuzetkom nekoliko rodova kao što su *Ischaemum L.* i *Schizachyrium Nees*, a jedan od njih je obično muški ili sterilan.

2.2. Klimatski uvjeti

Općenito, skupina *Miscanthus* je biljna vrsta koja je vrlo tolerantna na različite ekološke uvjete. Evolucija roda dovela je do razvoja karakteristika biljaka koje im omogućuju da izdrže visoke temperature, mraz, sušu i poplave, dok proizvodnja biomase varira u različitim stanišnim uvjetima. Većina vrsta C4 najprikladnija je za tropsku i suptropsku klimu. Ipak, većina vrsta C4 ima vrlo niske stope rasta u umjerenim klimatskim uvjetima. Naturalizacija miskantusa u umjerenijim klimatskim uvjetima ukazuje na njegovu relativnu toleranciju na temperaturu i dostupnost vode. Iako je miskantus prilagođeniji umjerenom klimi od većine drugih C4 usjeva, rast nordijskog miskantusa ograničen je niskim temperaturama.

Temperatura utječe na rast i razvoj miskantusa te regulira duljinu vegetacije. Početak vegetacije određen je datumom posljednjeg mraza u proljeće, a završetak je određen

datumom prvog mraza u jesen. Temperatura snažno utječe na razvoj listova miskantusa, a temperature između 5 i 10 °C poznate su kao temperaturni prag za rast. Temperatura zraka značajno je utjecala na ukupni razvoj listova i cijelog usjeva, prinos i duljinu vegetacije miskantusa. Prinos miskantusa u sjevernoj Europi ograničen je niskim temperaturama i niži je od onog u južnoj Europi osim ako voda nije ograničavajući čimbenik.

Sposobnost prezimljavanja biljaka miskantus ovisi o otpornosti njihovih rizoma na hladnoću. Prisutnost debelih pupova oko točke rasta, kao i uspavanih pupova na rizomima tla omogućuje miskantusu da odoli blagim proljetnim mrazovima. Na temperaturama ispod -5 °C izbojci i listovi u razvoju odumiru. Prva pojava mraza označava kraj vegetacije miskantusa.

Vjetar također igra ulogu u uspješnoj sadnji miskantusa. Postoji opasnost od polijeganja usjeva i/ili oštećenja lišća pri jakom vjetru. Unatoč učinkovitosti korištenja vode, miskantus pozitivno reagira na dodatnu opskrbu vodom zbog velike proizvodnje biomase. Miskantus, iako pokazuje vrlo visoku učinkovitost korištenja vode, još uvijek zahtijeva navodnjavanje na većini mjesta kako bi postigao svoj maksimalni potencijal prinosa. Također je utvrđeno da miskantus uspješno raste na tlima s visokim nivoom podzemne vode. U područjima s visokom podzemnom vodom miskantus se može uspješno uzgajati bez navodnjavanja, dajući tek nešto niže prinose suhe tvari u odnosu na potpuno navodnjavane parcele.

2.3. Zahtjevi prema tlu

Miskantus nema posebne zahtjeve za tlo jer uspješno raste na većini kultiviranih tla. U nekim dijelovima EU-a pjeskovita tla i pjeskovita ilovača s udjelom gline većim od 10 % navedena su kao poželjna tla. Uspjeh uzgoja ove kulture na pjeskovitim tlima i vrlo skeletnim tlima ovisi o količini i dostatnosti oborina. Dobri prinosi se također mogu naći na dobro dreniranim tlima s visokim sadržajem humusa. Za uspješan usjev miskantusa u travnju i svibnju potrebno je tlo prije sadnje prozračiti i pripremiti. Tlo također mora izdržati mehanizaciju tijekom berbe pa vlažna tresetna tla nisu pogodna za uzgoj miskantusa. Miskantus ima duboko korijenje (> 1 m) i stoga zahtijeva dublja nizinska i dolinska tla. Tekstura tla, boja i pH također doprinose dinamici rasta. Tamna tla laganije teksture pomoći će ubrzanju rasta, a optimalni pH tla mora biti između 5,5 i 7,5.

Sumarno o tlu:

- Tlo pogodno za uzgoj kukuruza može biti pogodno i za uzgoj miskantusa.
- Najpogodnije tlo za miskantus je pjeskovita ili praškasta ilovača, s dobrom aeracijom, visokim udjelom vode i visokim udjelom organske tvari; problematično je samo vlažno tlo.
- Ako se kultura uzgaja na plitkom tlu uz duge ljetne suše, maksimalni prinos ne može se postići iako su rast usjeva i opstanak mogući.
- Hladna i teška tla te poplavljena tla (npr. glina) nisu pogodna za uzgoj miskantusa koji nije potpuno razvijen u 5. godini i karakterizira ga spori rast i mali broj stabljika.
- Miskantus može rasti na pjeskovitim tlima s niskim udjelom vlage, ali su prinosi u takvim uvjetima manji.

2.3. Miskantus kao C4 biljka i učinkovitost korištenja resursa

Miskantus provodi fotosintezu kao C4 biljka. Na ovom putu prvi spoj koji nastaje fiksacijom CO₂ je organska kiselina sa 4 ugljika (oksaloacetat) katalizirana fosfoenolpiruvat karboksilazom. Put C4 izravno utječe na učinkovitost korištenja resursa usjeva. Na primjer, doprinosi visokoj učinkovitosti korištenja vode kroz smanjenu evapotranspiraciju tako što dulje drži puči zatvorene i fiksira dostupni CO₂ učinkovitije nego u C3 putu [4]. Miskantus koji je nepripitomljen nadmašuje mnoge druge C4 biljke u umjerenim klimatskim uvjetima u smislu učinkovitosti korištenja resursa i sposobnosti

rasta u uvjetima niskih temperatura. *M. x giganteus* sposoban je provoditi fotosintetsku aktivnost na temperaturama od čak 6 °C. Unatoč tome što je C4 biljka, neki genotipovi miskantusa otporni su na hladnoću i mogu preživjeti teške zime.

Miskantus postiže visoku učinkovitost korištenja hranjivih tvari na tri načina: 1. niski zahtjevi za unosom, 2. recikliranje hranjivih tvari opadanjem stelje, 3. translokacija hranjivih tvari natrag u rizome. Recikliranje hranjivih tvari uvelike ovisi o učinkovitosti procesa translokacije, što je opet uglavnom definirano fenološkim svojstvima genotipa i vremenom berbe. Rano cvjetajući genotipovi učinkovitije dovršavaju translokaciju hranjivih tvari prije nego što mraz ubije stabljike.

2.4. Tolerancija na abiotičke stresove

Miskantus se pokazao produktivnim na poljoprivrednom zemljištu nižih kvaliteta, uključujući slana tla [6] i zemljištima kontaminiranim teškim metalima. Međutim, klasičan genotip *M. x giganteus* pokazuje ograničenja s obzirom na abiotičke stresove, posebice sušu. Stoga je glavna svrha identificirati relevantna svojstva i mehanizme za abiotičke stresove suše, saliniteta, hlađenja i mraza, koji su mjerodavni za proizvodnju miskantusa [4].

Genotipovi koji su nadmašili *M. x giganteus* u uvjetima suše identificirani su među tipovima i hibridima *M. sacchariflorus*, kao i *M. sinensis*. Utvrđeno je da se tolerancija na sušu osigurava kombinacijom osobina navedenih biljaka [4]. Genotipovi otporni na salinitet koji toleriraju vrijednosti električne vodljivosti do 2,5 bez značajnih gubitaka prinosa identificirani su među *M. sacchariflorus* i *M. sinensis*. *M. x giganteus* nije se pokazao otpornim na slanost. Utvrđeno je da genotipovi s najboljim učinkom koriste sisteme koji kontinuirano onemogućavaju nagomilavanje iona u lišću i na taj način minimizira oštećenja bitnih fizioloških mehanizama kao što je fotosinteza [4]. Općenito je utvrđeno da su biljke s većim rizomima tolerantnije na slanost od biljaka s manjim rizomima.

Procjena otpornosti na mraz otkrila je da među *M. sinensis* i hibridnim tipovima postoji više tolerantnih genotipova od *M. x giganteus* [4]. Tolerancija na hladnoću i mraz glavni su sistemi koji omogućuju proširenje raspona proizvodnje miskantusa u Europi dalje na sjever i istok.

2.5. Ciljevi uzgoja

Za sve programe uzgoja miskantusa osnovni je zadatak povećati prinos biomase uz najmanje inpute u različitim klimatskim uvjetima. U nedavnom EU projektu OPTIMISC otkriveni su novi hibridi koji mogu premašiti *M. × giganteus*, posebno u neadekvatnim uvjetima uzgoja kao što su suša, hladnoća ili slanost [4]. Prinos suhe tvari usjeva i energije po hektaru, koji ovise o korištenom putu pretvorbe energije, glavni su kriteriji za ocjenu učinkovitosti usjeva za bioenergiju [7]. Uzgoj nastoji uvećati neto prinos energije kroz poboljšanje efikasnosti iskorištavanja resursa usjeva i kvalitete biomase za različite mogućnosti korištenja, uz održavanje visokog prinosa biomase [4].

Ovakav uzgoj uključuje složene procese, a uzgajivači moraju koristiti jednostavnije mjere tijekom cijele sezone, kao što su visina stabljike i gustoća freze, kako bi napravili selekciju. Najrelevantnije uzgojne selekcije vrše se na parcelama budući da su parcele često zahtjevan resurs, a jeftiniji rasadnici biljaka često se koriste u početnim koracima uzgoja. Značajke kakvoće biomase bitne su pri odabiru genotipova za specifične namjene. Međutim, često se opaža kompromis između kvalitete i prinosa. Za potrebe izgaranja preferiraju se genotipovi koji rano stare i sadrže niski sadržaj vode, pepela, kalija (K) i klorida (Cl). Visoki sadržaji lignina poželjni su za izgaranje biomase miskantusa. Naime, genotipovi s nižim količinama lignina bolji su za potrebe fermentacije kao što su anaerobna fermentacija i proizvodnja etanola. Trenutno se *M. x giganteus* uzgaja na terenu skupim vegetativnim metodama razmnožavanja. Većina napora u oplemenjivanju trenutačno je usmjerena na hibrid na bazi sjemena.



Slika 2: Terenske parcele s različitim genotipovima miskantusa na pokusnoj poljskoj postaji „Ihinger Hof“, južna Njemačka [4]

Tablica 1: Osobine biljke miskantus [3]

| Prinos suhe tvari cijele biljke t/ha | Prosjek 20 – 30 |
|---|---|
| Gnojidba | Miskantus je višegodišnja zeljasta trava s rizomima, koja ima sposobnost mobilizacije i remobilizacije hraniva između različitih organa. Jedini trajni organ su rizomi (podzemne stabljike) s funkcijom vegetativnog razmnožavanja i skladištenja hraniva. Interno kruženje nutrijenata između nadzemnih i podzemnih organa omogućava žetvu biomase niskog sadržaja hraniva, ali komplicira kvantifikaciju i optimizaciju gnojidbe. 50 kg N, 21 kg P ₂ O ₅ i 45 kg K ₂ O po ha dovoljno je za osiguranje adekvatnog prinosa. |
| Plodored | Jednom posađen traje > 20 godina. |
| Posebni rizici (suša, životinje...) | Lako se adaptira na naše agroekološke uvjete. Osjetljiv na sušu u južnim područjima RH. Nisu pogodna prevlažna i močvarna tla. |
| Postojeća tehnika proizvodnje u RH | Dobra s izrazitim potencijalom |
| Sjetvena norma | 10.000 – 15.000 rizoma/ha |
| Vrijeme žetve | Jesen poslije prvog mraza do početka rasta nove vegetacije (ožujak, početak travnja) |

Izvor: Pravilnik o popisu biljnih vrsta za osnivanje drvenastih kultura kratkih ophodnji te načinu i uvjetima pod kojima se mogu uzgajati. NN 16/2019

3. GLOBALNA PROIZVODNJA I UPOTREBA MISKANTUSA

Trenutačno se u svijetu za proizvodnju biomase koristi oko 123 000 ha zemlje. Najveće područje proizvodnje nalazi se u Kini, gdje na jezeru Dongting raste oko 100 000 ha *Miscanthus lutarioriparius* [4]. Biomasa se uglavnom koristi za izradu papira, ali i kao građevinski materijal te za hranu. U Europi postoji 20 000 ha miskantusa uglavnom u Ujedinjenom Kraljevstvu, Francuskoj i Njemačkoj, kao što se može vidjeti u tablici 2.

U Ujedinjenom Kraljevstvu glavna primjena biomase miskantusa je proizvodnja električne energije u namjenskim elektranama. U Njemačkoj prevladava toplinska konverzija u malim toplanama. Upotreba miskantusa uključuje građevinske materijale i biokompozite. Osim nekoliko hektara *M. sinensis* koji se koristi kao slama u termoelektranama u Danskoj, samo jedan genotip *M. x giganteus* komercijalno se uzgaja u Europi. *M. x giganteus* također se uzgaja na oko 3200 ha u Sjedinjenim Američkim Državama.

Tablica 2: Sadašnja komercijalna proizvodnja miskantusa i primjena biomase [4]

| Država | Površina (ha) | Genotip | Primjena biomase |
|---------------|----------------|-----------------------------------|--|
| Kina | 100,000 | <i>Miscanthus lutarioriparius</i> | Izrada papira, građevinski material |
| Europa | 19,050 | | |
| UK | 10,000 | <i>Miscanthus x giganteus</i> | Zajedničko loženje u proizvodnji električne energije |
| Njemačka | 4,000 | <i>M. x giganteus</i> | Toplinska energija, građevinski materijal |
| Francuska | 4,000 | <i>M. x giganteus</i> | Toplinska energija, gorivo za sušenje i peletiranje, građevinski materijal, prostirka za životinje |
| Švicarska | 500 | <i>M. x giganteus</i> | Građevinski materijal |
| Poljska | 500 | <i>M. x giganteus</i> | Građevinski materijal, biokompoziti |
| Danska | 50 | <i>Miscanthus sinensis</i> | Slama |
| Austrija | 1000 | <i>M. x giganteus</i> | Izgaranje, malčiranje |
| SAD | 3,200 | <i>M. x giganteus</i> | Toplinska i električna energija, prostirka za životinje, aditiv vlakna za stočnu hranu |

Izvor: Autor

3.1. Neenergetska mogućnost korištenja miskantusa

Miskantus se može koristiti i u neenergetske svrhe, za proizvodnju papira, građevinskog materijala, malča, plastike te kao prostirka za životinje [4]. Osim toga, može se koristiti za poboljšanje strukture tla, smanjenje erozije, a također i u procesima fitoakumulacije biljaka [8]. Fitoakumulacija je metoda sanacije onečišćenog tla uz pomoć nižih ili viših biljaka. Primjenom ove tehnologije postignuti su najbolji rezultati u uklanjanju teških metala i eksploziva iz zemlje. Takve su biljke sposobne akumulirati onečišćujuće tvari u korijenskom sustavu te ih prenositi i akumulirati u nadzemnim dijelovima. Nakon što biljke vežu teške metale, uklanjaju se s površine i skladište na odlagalištima ili spalionicama te u cementarama ili željezarama, gdje se spaljuju. Postupak se ponavlja nekoliko puta, ovisno o stupnju onečišćenja, kako biste što bolje očistili tlo i učinili ga pogodnim za druge namjene.

3.1.1. Upotreba miskantusa kao materijala

Najveća količina biomase miskantusa proizvodi se u Kini iz *M. lutarioriparius* koji raste u divljim uvjetima u poluprirodnom staništu i ubire se za izradu papira [4] te se transportira do tvornice kao što je vidljivo na slici 3. U Kini se biomasa miskantusa također koristi kao građevinski materijal i za hranu. Građevinski i ambalažni materijali najčešća su upotreba biomase miskantusa u Europi.



Slika 3: *Miscanthus lutarioriparius* na jezeru Dongting (Kina) lijevo, transport biomase u tvornicu papira desno [4]

Zbog svoje velike sposobnosti upijanja vode, miskantus vlakna posebno su prikladna za ambalažni materijal koji treba apsorbirati tekućinu. Ova značajka iskorištena je za razvoj ambalažnog materijala za zračni transport tekućina. Slika 4 prikazuje lagani beton na bazi miskantus agregata [9]. Miskantus je koristan agregat za betonske smjese zbog sloja silicija na njegovoj vanjskoj ljusci [9]. Utvrđeno je da je kalcijev klorid najučinkovitiji mineralizator koji cementu daje visoku tlačnu čvrstoću i dobru vezu između agregata miskantusa. Tlačna čvrstoća ovog betona usporediva je s drugim lakim betonskim mješavinama i pokazuje dobru toplinsku vodljivost [9]. Lagani beton na bazi biomase miskantusa ima nekoliko prednosti u odnosu na mješavine na bazi pijeska ili šljunka, uključujući bolja izolacijska svojstva, poboljšanu zaštitu od pregrijavanja ljeti i veliku trajnost. Dugi vijek trajanja posljedica je dobre sposobnosti mineralnog vezivanja materijala miskantusa [9].



Slika 4: Lagani beton na bazi biomase miskantusa [9]

3.1.2. Miskantus kao prostirka za životinje

U Francuskoj se miskantus koristi kao prostirka za purane. U usporedbi s uobičajenom podlogom na slami, duboka stelja miskantusa ima prednost boljeg upijanja vode i adsorpcije amonijaka, izbjegavajući potrebu za obnavljanjem prostirke tijekom razdoblja rasta purana. Osim toga, purice su na miskantusu zdravije nego na podlozi od slame s manje uočenih štetnika i ozljeda nogu (slika 5).



Slika 5: Purice na podlozi od miskantusa lijevo, zdrave noge purana na miskantusu desno [9]

Istraživanja su također pokazala prikladnost miskantusa kao podloge za krave i konje [4]. U četverotjednom pokusu u kojem se uspoređuju podloga od miskantusa i slamnata podloga za konje utvrđene su iste prednosti miskantusa kao i kod prostirke za purice, posebno u pogledu visokih higijenskih standarda [4]. Usporedba prostirke od miskantusa, slame i drvene sječke također je pokazala da podloga miskantusa proizvodi manju masu i volumen stajskog gnoja uz veću nasipnu gustoću. To rezultira manjim zahtjevima volumena za skladištenje stajskog gnoja i kraćim vremenom potrebnim za izbacivanje. Međutim, prostirka miskantusa skuplja je zbog većih troškova materijala i dodatnih zahtjeva za grubom hranom [4]. Zbog toga se podloga miskantusa posebno preporučuje za profesionalni konjički sport, farme konja kojima je potrebno smanjiti količinu gnojiva i vlasnike konja s alergijom [4].

3.2. Energetska mogućnost korištenja miskantusa

Miskantus se trenutno uglavnom koristi za zajedničko loženje s ugljenom ili neovisno izravno izgaranje za proizvodnju topline ili električne energije. Različitim tehnikama zbijanja proizvedena se biomasa prerađuje u čvrsta biogoriva: brikete i pelete (Bilardžija i sur., 2017.) vidljive na slici 6 i 7. Proces briketiranja ili granulacije omogućava učinkovitije korištenje miskantusa za proizvodnju zelene energije. Kako bi se izbjegli dodatni troškovi zbijanja, miskantus se može koristiti i u tzv. rinfuznom stanju, odnosno u obliku velikih bala ili sječke [8]. Može se koristiti zajedno s drugim sirovinama tijekom anaerobne digestije u proizvodnji bioplina, ali i za proizvodnju bioetanol druge generacije koji spada u skupinu tekućih biogoriva.



Slika 6: Miskantus u formi briketa [9]



Slika 7: Miskantus u formi peleta [9]



Slika 8: Miskantus u formi bale [9]



Slika 9: Miskantus u formi sječke [9]

Energetsko korištenje uzgoja miskantusa može značajno sačuvati fosilnu energiju: na primjer, 20 tona biomase miskantusa ekvivalentno je 12 tona ugljena, a 30 tona te biomase je ekvivalentno 12.000 litara loživog ulja. Zaključno, sa sigurnošću se može reći da proizvodnja "zelene" energije ima potencijal pozitivno pridonijeti ekološkim problemima u poljoprivrednom sektoru te na globalnoj razini.

3.2.1. Izgaranje miskantusa

U Europi se veliki udio biomase miskantusa koristi za izgaranje za proizvodnju topline, električne energije ili kombinirane toplinske i električne energije [4]. Izravno loženje biomase koristi se u termoelektranama i u malim plamenicima na biomasu. Trenutačno se razvija i tržište za kotlove za grijanje na pelete u svrhu zadovoljavanja potreba grijanja. Prikladnost biomase za izgaranje ovisi o sadržaju pepela, kalija i klorida te o ponašanju pepela pri taljenju [4]. Prijavljeno je da sadržaj K varira od 0,11 % do 1,2 % i Cl od 0,03 % do 0,16 %, ovisno o genotipu i vremenu žetve. Kloridi stvaraju korozivne spojeve koji potencijalno oštećuju kotlove, a visok udio kalija snižava temperature taljenja pepela.

Za većinu klasičnih tehnologija izgaranja biomase vrlo je važna visoka točka taljenja pepela, a takve su tehnologije razvijene za drvenu biomasu i podrazumijevaju minimalnu temperaturu taljenja pepela od 1200 °C kako bi sigurno radile. Štoviše, danas su raspoložive i tehnologije izgaranja koje mogu normalno raditi i uz niže temperature taljenja pepela (npr. izgaranje u fluidiziranom sloju, kotlovi s rešetkama hlađenim vodom) ili koje zapravo zahtijevaju niske temperature taljenja pepela [npr. veliki kotlovi (ugljen) s ispuštanjem tekućeg pepela]. Za *M. × giganteus* zabilježeno je taljenje pepela na 900 °C [4].

Utvrđene su značajne varijacije u točkama taljenja pepela među različitim genotipovima uzgojenim u Njemačkoj [10]. U Nizozemskoj su neki testirani genotipovi *M. sinensis* pokazali da se pepeo ne topi do 1100 °C [11]. Varijacija nudi priliku za odabir odgovarajućih genotipova i razvoj tehnika žetve i nakon žetve kako bi se maksimizirala temperatura fuzije pepela. Unaprjeđenje kvalitete biomase duž proizvodnog lanca moguće je uz brojne mogućnosti. Na primjer, vrijeme žetve ima snažan utjecaj na anorganske sastojke biomase, koji naknadno utječu na ponašanje pepela pri taljenju. Za potrebe izgaranja ožujak se smatra optimalnim vremenom žetve u umjerenim regijama za isporuku biomase s niskim sadržajem kalija, klorida, pepela i vlage.

3.2.2. Bioplin

Upotreba biomase miskantusa za proizvodnju bioplina⁷ primjena je koja se trenutačno istražuje te još nije potpuno istražena u praktičnim bioplinskim postrojenjima. Postoji nekoliko izazova koje je potrebno prevladati prije nego što se miskantus može smatrati glavnom kulturom za proizvodnju bioplina [12]. Kako bi se omogućio visok prinos po površini i odgovarajuća kvaliteta biomase, važno je pronaći odgovarajuće vrijeme žetve. Žetva u proljeće nije povoljna za anaerobnu fermentaciju biomase miskantusa, što stvara posebno velike izazove u uzgoju [12]. Tijekom zime javljaju se gubici biomase koji smanjuju prinos bioplina. Izuzev navedenog, tijekom jeseni i zime dolazi do povećanja sadržaja lignina, što u krajnosti rezultira nižim kvalitetama biomase za anaerobnu fermentaciju budući da je lignin u negativnoj korelaciji sa specifičnim prinosom bioplina [13]. Iz tog se razloga miskantus mora ubrati dok je još zelen, i to prije zime. Zbog napredovanja vegetacijskog razdoblja, odnosno procesa lignifikacije, dolazi do opadanja kvalitete biomase za proizvodnju bioplina. To znači da bi ranija berba (npr. kolovoz) bila poželjnija s gledišta kvalitete, ali se ne može preporučiti za *M. × giganteus* zbog značajnog smanjenja prinosa u sljedećoj godini. Rana zelena berba zahtijevala bi genotipove s poboljšanom tolerancijom na zelenu rezidbu, koji još nisu otkriveni [4]. Tolerancija zelene rezidbe većinom je u vezi s premještanjem ugljikohidrata u rizom, koji su potrebni za nicanje i ponovni rast u sljedeće proljeće [13].

U Europi *M. × giganteus* je među genotipovima s najvećim prinosom i još uvijek jedina komercijalno dostupna sorta. Zbog toga se preporuča za proizvodnju bioplina kada se bere na zeleno u listopadu. Kako bi se održala dugoročna produktivnost usjeva, hranjive tvari uklonjene ubranom biomasom moraju se zamijeniti primjenom digestata ili gnojiva. U literaturi su opisane različite tehnologije predobrade kao što su ekstruzija, mljevenje, ultrazvuk te tretmani bijelih i smeđih gljivica [14]. U praksi se takva tehnologija predobrade sve više koristi jer omogućuje korištenje jeftinijih ulaznih supstrata, npr. poljoprivrednih ostataka. Zbog svoje višegodišnje prirode, visokog potencijala prinosa i poboljšanja načina uzgoja, miskantus je perspektivna kultura za opskrbu velikim količinama jeftine biomase za anaerobnu digestiju.

⁷ Bioplin se dobiva anaerobnom razgradnjom ili fermentacijom organskih tvari, uključujući gnojivo, kanalizacijski mulj, komunalni otpad ili bilo koji drugi biorazgradivi otpad.

3.2.3. Tekuća biogoriva i biokemikalije

Miskantus nije tipična kultura za proizvodnju tekućih goriva (prva generacija biogoriva), jer ne sadrži ekstrahirajuća ulja i ima vrlo malo šećera. Biomasa miskantusa opisuje se se kao lignoceluloza sa visokim sadržajem (celuloza + hemiceluloza = holoceluloza). Na sadržaj celuloze, hemiceluloze i lignina može utjecati izbor genotipa i vrijeme žetve biomase [11]. Zbog sve većeg broja tvornica za proizvodnju biogoriva druge generacije u cijelom svijetu, miskantus ima potencijal postati glavna kultura biogoriva [4].

Rafinerije biogoriva druge generacije mogu se klasificirati prema korištenim putevima pretvorbe: (1) termokemijski (npr. rasplinjavanje i piroliza) i (2) biokemijski. Na putu biokemijske pretvorbe biomasa se prethodno obrađuje, a celuloza i hemiceluloza se enzimski hidroliziraju u C6 i C5 šećere. Posljednjih godina razvijeni su sojevi kvasca koji mogu pretvoriti ne samo C6 nego i C5 šećere u etanol, omogućujući da se veći dio holoceluloze iskoristi za proizvodnju biogoriva. Dok put biokemijske pretvorbe može koristiti samo holocelulozu, put termokemijske pretvorbe također može pretvoriti lignin u biogoriva. Zbog svega navedenog putevi termokemijske pretvorbe obično se primjenjuju za preradu drva ili drvenastih sirovina, a putevi biokemijske pretvorbe većim se dijelom koriste za poljoprivredne ostatke, poput pšenične i kukuruzne slame, s manjim sadržajem lignina. Miskantus daje prikladnu nadopunu takvim ostacima jer se bere u proljeće u vrijeme kada nema drugih ostataka (npr. pšenična slama ljeti, kukuruzna slama u jesen). Kombinacijom ova tri izvora sirovina mogu se izbjeći duga i skupa razdoblja skladištenja. U literaturi je objavljena prikladnost novih genotipova miskantusa za proizvodnju bioetanola, što ukazuje na veliki potencijal ove kulture [11].

Uz proizvodnju biogoriva pretvorba biomase u platformske kemikalije za korištenje u raznim sektorima, uključujući bioplastiku, trenutačno je obećavajuće područje istraživanja i razvoja, s ciljem uspostavljanja bioekonomije u kemijskoj industriji. Oba puta konverzije prikladna su za biokemijsku proizvodnju: npr. termokemijski put može se primijeniti za proizvodnju 5-hidroksimetilfurfurala, a biokemijski put za proizvodnju izobutanola. To omogućuje visokovrijednu primjenu biomase miskantusa, koja ujedno može pridonijeti osiguravanju potražnje za biomasom rastućeg biogospodarstva.

3.3. Troškovi proizvodnje biomase

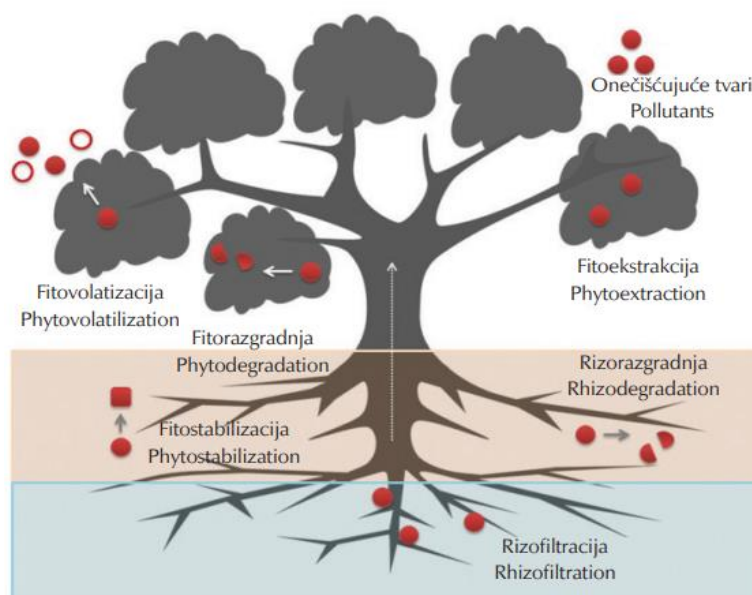
Troškovi proizvodnje biomase miskantusa na osnovi tonaže uglavnom ovise o ubranom prinosu, ali i o troškovima proizvodnih čimbenika (kao što su zemljište i rad), metodama uzgoja i berbe te potrebi za zgušnjavanjem, skladištenjem i transportom [4]. Za jedini komercijalno uzgojen genotip, *M. × giganteus*, uspostavljanje usjeva je dominantni faktor troškova na oko 3000 € ha^{-1} , a ta visoka početna ulaganja odvrćaju mnoge poljoprivrednike od proizvodnje miskantusa.

Studija [15] je procijenila troškove opskrbe biomasom miskantusa, uključujući proizvodnju, zgušnjavanje i transport biomase od farme do jedinice u kojoj se spaljuje ili prerađuje u etanol ili izolacijski materijal. Oni se kreću od 78 € po toni suhe mase (za lokalnu, malu proizvodnju) i 79 € po toni silaže (50 % vode) za proizvodnju bioplina, do oko 140 € po toni suhe mase bala za proizvodnju izolacijskog materijala, etanola i peleta. Troškovi su procijenjeni za niz novih genotipova uzgojenih na različitim lokacijama diljem Europe.

Tri glavna potencijala za smanjenje budućih troškova proizvodnje biomase miskantusa su: (1) veći prinosi kroz uzgoj genotipova otpornijih na stres i veći prinos, kao i optimizacija upravljanja usjevima; (2) smanjenje troškova uzgoja kroz razvoj metoda uzgoja temeljenih na sjemenu i (3) optimizirane, učinkovite metode sakupljanja s niskim gubicima koje osiguravaju visokokvalitetnu biomasu.

3.4. Obnova zemljišta (fitoremedijacija)

Fitoremedijacija je niz procesa koji koriste biljke, zajedno s njihovim enzimima i okolišnim mikroorganizmima prisutnim u zoni korijena za izolaciju, transport, detoksikaciju i mineralizaciju ksenobiotika u tlu, čime se smanjuje njihova koncentracija, pokretljivost ili toksični učinci [16]. Fitoremedijacija se koristi za uklanjanje zabrinjavajućih vrsta zagađivača i njihovih složenih mješavina. Riječ je o teškim metalima, radionuklidima i organskim ksenobiotičima, koji uglavnom dopijuju u tlo zbog rutinskih antropogenih aktivnosti u poljoprivrednom sektoru, atmosferskog taloženja u zraku i nepravilnog odlaganja otpada [16].



Slika 10: Mehanizmi fitoremedijacije [16]

Zbog svog učinkovitog recikliranja hranjivih tvari i niskih zahtjeva za unosom, miskantus ima potencijal rasti na marginalnim zemljištima. Zbog toga je od interesa za uzgoj na kontaminiranom zemljištu u svrhu sanacije tla. Jedna studija koja je istraživala uzgoj miskantusa na zemljištu kontaminiranom policikličkim aromatskim ugljikovodicima (PAH) pokazala je da ima pozitivan utjecaj na razgradnju PAH-a [15]. Druga studija koja je testirala upotrebu miskantusa u puferskim trakama za kontrolu ispiranja nitrata i izbjegavanje onečišćenja podzemnih voda pokazala je pozitivne rezultate sa smanjenjem ispiranja nitrata 60 % – 70 % [17]. Može se uzgajati i u svrhu fitoekstrakcije ili fitostabilizacije onečišćenja tla. Na primjer, ima potencijal remedijacije tla

kontaminiranih cinkom (Zn) putem fitoekstrakcije [18], pri čemu je *M. sinensis* najprikladniji genotip jer ne pokazuju značajno smanjenje akumulacije biomase tlima kontaminiranim cinkom [19]. Miskantus je također učinkovit kod sanacije tala koja su onečišćena barijem (Ba) i niklom (Ni). Studija koja je provedena u svrhu testiranja miskantusa na tlima onečišćenim teškim metalima pokazala je da on pomaže u izbjegavanju onečišćenja podzemnih voda fitostabilizacijom navedenim metala [18].

4. MIKROPROPAGACIJA

Mikropropagacija biljaka je integrirani proces u kojem se stanice, tkiva ili organi odabranih biljaka izoliraju, steriliziraju i inkubiraju u aseptičnom okruženju koje potiče rast kako bi se dobilo mnogo kloniranih sadnica [20]. Tehnika izoliranog kloniranja pokazala je činjenicu da se somatske stanice, pod odgovarajućim uvjetima, mogu diferencirati na cijelu biljku. Termin mikropropagacija se općenito koristi za aseptičke kulture stanica, tkiva, organa i njihove komponente pod definiranim kemijskim i fizikalnim uvjetima *in vitro* [20]. Podloga za kulturu biljnih tkiva je umjetna hranjiva tvar s dodatkom organskih i anorganskih hranjiva koja se koriste za uzgoj medija biljnih tkiva. Kulturni medij koji se koristi za *in vitro* uzgoj biljnih stanica sastoji se od tri osnovne komponente: esencijalnih elemenata (normalnih iona), organskih dodataka i izvora fiksog ugljika. Kada se uzgajaju u odgovarajućem mediju s auksinom i citokininom, eksplantati stvaraju neorganiziranu, rastuću i dijeleću masu stanica zvanu "kalus".

Mikropropagacija je i dalje važan alat za masovnu proizvodnju klonskih sadnica nekoliko važnih biljnih vrsta koje zadržavaju genetsku istovjetnost [21]. U nekim je slučajevima mikropropagacija jedina tehnika koja podržava uzgoj i promiče ekonomsku vrijednost određenih poljoprivrednih vrsta. Mikropropagacija biljaka riješila je mnoge fitosanitarne probleme i omogućila ekspanziju i pristup visokokvalitetnim biljkama za uzgajivače iz različitih zemalja i gospodarskih sredina, čime je učinkovito pridonijela ekspanziji poljoprivrede u ovom i prošlom stoljeću [21].

Osnovna oprema za pripremu medija uključuje autoklav, pH metar, analitičke i poluanalitičke vage te mjerne instrumente i posude; oprema za zagrijavanje, miješanje i izlivanje; hlađenje; sustav za destilaciju/deionizaciju vode; skladišta te prostor za pranje alata i opreme. Veliki, komercijalni laboratorij koristit će industrijsku opremu i metode

za održavanje i praćenje zaliha medijskih komponenti i medija, proizvoditi i sterilizirati velike serije, označavati, skladištiti, saditi i odlagati tisuće posuda dnevno.

4.1. Vrste mikropropagacije miskantusa

Postoje dvije vrste mikropropagacije: izravna i neizravna. Izravna metoda mikropropagacije – također kategorizirana kao kultiviranje *in vitro* – uključuje razvoj pupova iz aksilarnih čvorova i apikalnih meristema i korisna je za uzgojne interese očuvanjem genetske uniformnosti (jedinke identičnih genotipova i fenotipova). Metode neizravne mikropropagacije uglavnom su usmjerene na somatsku embriogenezu kroz nezrele kulture cvatova, što može biti prednost za stvaranje lakše genetske transformacije radi poboljšanja vrste. Iako su drugi eksplantati korišteni kao izvorni materijal (npr. dijelovi listova i korijena), kontaminacija, nekroza tkiva i specifičnost vrste/genotipa spriječili su da se ti eksplantati više koriste u komercijalnim primjenama.

Koraci za neizravnu mikropropagaciju uključuju: indukciju embriogenog kalusa, regeneraciju sadnica, *in vitro* kultiviranje te *in vitro* ili *ex vitro* ukorjenjivanje. Izravna mikropropagacija razlikuje se po slijedu događaja isključujući indukciju embriogenog kalusa i regeneraciju sadnica, a umjesto toga moraju proći "indukciju izdanaka" prije faze proizvodnje bočnih izdanaka. U pojedinim znanstvenim radovima regenerirani/inducirani grozdovi izdanaka izloženi su mediju za ukorjenjivanje prije nego što se podvrgnu fazi proizvodnje bočnih izdanaka.

4.2. Faze mikropropagacije

Mikropropagacija je složen proces koji se sastoji od nekoliko koraka, a važno je svaki korak ispravno izvesti kako bi se uspostavila *in vitro* kultura, a uspješna mikropropagacija uključuje pet glavnih faza [20] - Nulta faza: izbor i priprema matične biljke, faza I.: uspostavljanje aseptične kulture, faza II.: faza multiplikacije, faza III.: *in vitro* ukorjenjivanje i faza IV.: aklimatizacija i prijenos biljaka u *ex vitro* uvjete.

0. Nulta faza: Izbor i priprema matične biljke - Prije početka mikropropagacije treba obratiti pažnju na odabir matičnih biljaka. Matične biljke moraju biti tipične za sortu ili vrstu i bez simptoma bolesti. Možda bi bilo korisno tretirati odabranu biljku (ili njezine dijelove) na neki način kako bi *in vitro* kultura bila uspješna. Rast, morfogeneza i stope razmnožavanja *in vitro* mogu se poboljšati odgovarajućom prethodnom ekološkom i kemijskom obradom matičnih biljaka. Identificiranje i eliminacija štetnika kod biljaka trebali bi biti sastavni dio mikropropagacije, ali te mjere opreza nažalost su često izostavljene, ponekad sa štetnim posljedicama.

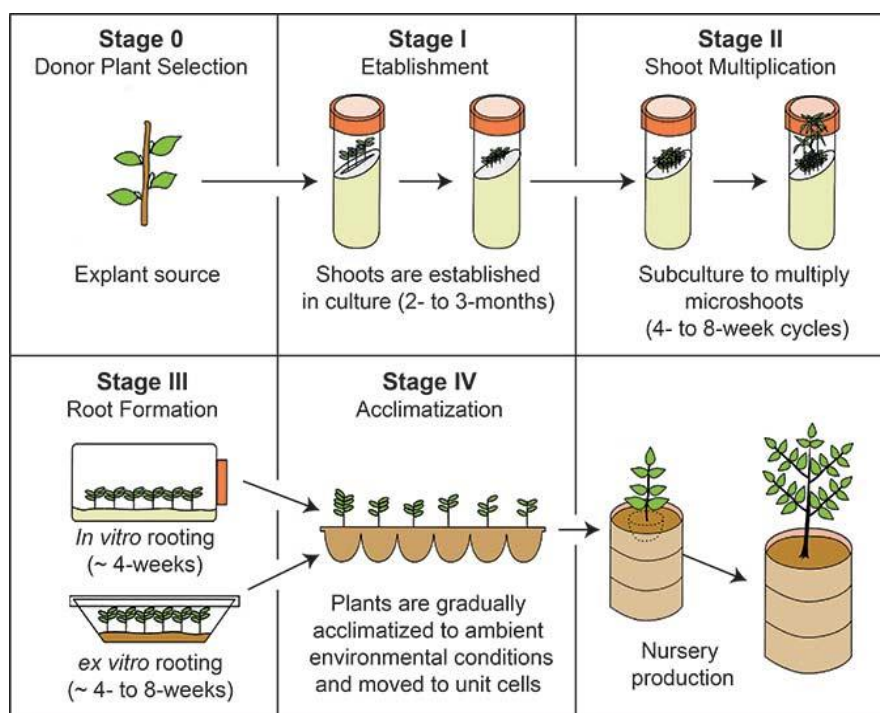
1. Faza I.: Uspostavljanje aseptične kulture - Uobičajeni drugi korak procesa mikropropagacije je stvaranje aseptične kulture odabranog biljnog materijala. Ova faza zahtijeva da eksplantati budu prenijeti u kulturno okruženje bez očitih mikrobnih kontaminanata te nakon toga treba uslijediti neka vrsta rasta (npr. rast vrha izbojka ili stvaranje kalusa). Obično se serija eksplantata prenosi u kulturu u isto vrijeme. Nakon kratkog razdoblja inkubacije odbacuje se svaki spremnik za koji se utvrdi da ima kontaminirane eksplantate ili medij. I. stupanj smatrao bi se zadovoljavajuće završenim ako je odgovarajući broj eksplantata preživio bez kontaminacije i ako je rastao.

2. Faza II.: Faza multiplikacije - Cilj faze II. je dovesti do proizvodnje novih biljnih izdanaka ili propagula, koji, kada su odvojeni od kulture, mogu dati potpune biljke. U skladu s *in vitro* procedurom koja se provodi razmnožavanje se može postići iz novoizvedenih aksijalnih ili adventivnih izbojaka, somatskih embrija ili minijturnih organa za pohranu ili razmnožavanje. Neke od propagula proizvedenih u fazi II. (osobito izbojci) također se mogu koristiti kao osnova za daljnje cikluse umnožavanja jer se obično mogu ponovno uzgajati (podkultivirati) kako bi se povećao njihov broj.

3. Faza III.: *In vitro* ukorjenjivanje - Izbojci ili sadnice dobivene iz faze II. su malene i još nisu sposobne za samoodrživi rast u tlu ili kompostu. U fazi III. poduzimaju se koraci

za uzgoj pojedinačnih ili grozdova biljaka, sposobnih za fotosintezu i preživljavanje bez umjetne opskrbe ugljikohidratima. Neke je sadnice u ovoj fazi potrebno posebno tretirati kako ne bi zakržljale ako se iznesu iz kulturnog okruženja. Stadij III. često se prikladno dijeli na: Stadij III. a - produljenje pupova ili izdanaka formiranih tijekom faze II. kako bi se dobili izbojci prikladne veličine za stadij III. b; Stadij III.b - ukorjenjivanje izbojaka faze III. a *in vitro*.

4. Faza IV.: Aklimatizacija i prijenos biljaka u *ex vitro* uvjete - Konačno, nakon što se korijenje dobro učvrsti na mikroreznici, sadnice se moraju aklimatizirati na normalno okruženje za uzgoj u fazi IV. Metode kojima se sadnice prenose iz *in vitro* u *ex vitro* vanjsko okruženje izuzetno su važne. Ako se ne provodi pažljivo, prijenos može rezultirati značajnim gubitkom razmnoženog materijala. U praksi se sadnice vade iz njihovih spremnika, a ako su uzgajane na agarnome mediju, gel se pažljivo ispere iz korijena. U ovoj fazi preporučuje se nanošenje antitranspirantnog filma na listove, ali se u praksi čini da se rijetko koristi. Biljke se zatim presađuju u odgovarajući medij za ukorjenjivanje (kao što je kompost od treseta: pijesak). Konačno, nakon što se korijenje dobro učvrsti na mikroreznici, sadnice se moraju aklimatizirati na normalno okruženje za uzgoj u fazi IV.



Slika 11: Faze mikropropagacije [20]

4.3. Tehnički aspekti

Eksplantati: Za mikropropagaciju biljaka, odgovarajućih stanica, tkiva ili organa eksplantati se moraju uzeti iz izvornih biljaka i uspješno uzgajati. Kvaliteta eksplantata primarna je za uspjeh bilo koje sheme mikropropagacije. Odabranim biljnim tkivom ili organom, nakon što se isti ukloni iz izvora, mora se pažljivo rukovati kako bi se izbjegla nepotrebna fizička oštećenja, vanjska kontaminacija ili propadanje zbog duljeg vremena ili loših uvjeta skladištenja prije dolaska u laboratorij.

Asepsa: Konvencionalna mikropropagacija biljaka zahtijeva aseptično okruženje i aksenske kulture. To se idealno postiže površinskom sterilizacijom kontaminiranih eksplantata. Moraju biti stvoreni aseptični radni prostori, zaštićeni i izolirani od drugih područja laboratorija, čime se uspostavljaju progresivno čišći prostori koji uključuju strože ponašanje i rad.

Tehnologija čistih soba: Prema Međunarodnoj organizaciji za standardizaciju (ISO) čista soba definirana je kao "prostorija u kojoj se kontrolira koncentracija čestica u zraku i koja je izgrađena i korištena na način da se minimizira unošenje, stvaranje i zadržavanje čestica unutar prostorije i u kojoj se po potrebi kontroliraju drugi relevantni parametri, na primjer temperatura, vlažnost i tlak zraka“.

Dezinfekcija i sterilizacija: Sve što dolazi u dodir s biljnim materijalom potencijalni je zagađivač. Sterilizacija, dezinfekcija, osobna higijena i protokoli održavanja sastavni su čimbenici stvaranja i održavanja aseptičnog okruženja i proizvoda bez kontaminacije. Komercijalni laboratoriji opremljeni su autoklavima i/ili sterilizatorima za rasute medije koji se koriste za većinu sterilizacije medija, spremnika i alata.

Okolišni uvjeti: U komercijalnom laboratoriju za mikropropagaciju kritični su elementi okolišni uvjeti i njihova kontrola. Troškovi grijanja, hlađenja, ovlaživanja/odvlaživanja i filtriranja zraka i osvjetljavanja biljnog materijala često su bili ograničavajući čimbenik u osnovi troškova mikropropagacije biljaka. Moraju se pratiti i uzeti u obzir tri skupa uvjeta okoliša - (1) trenutna sezona i okoliš, uključujući temperaturu i vlažnost u neseptičnim, ambijentalnim područjima laboratorija, (2) kontrolirano okruženje prostorije za uzgoj, uključujući sanitarne uvjete i asepsu, temperaturu, vlažnost, protok i cirkulaciju zraka, kvalitetu i intenzitet svjetlosti i duljinu dana i (3) mikrookruženje

posude za rast uključujući asepsu, temperaturu, vlažnost, izmjenu plinova, intenzitet i kvalitetu svjetlosti, ishranu i potencijalni izvori stresa.

Temperatura: *In vitro* uvjeti rasta za većinu biljaka zahtijevaju temperaturu okoline od 22 do 27 °C. Neke vrste, faze rasta ili uvjeti skladištenja mogu zahtijevati različite ili promjenjive temperaturne režime. Grijanje i hlađenje prostorija za uzgoj te održavanje temperaturne stabilnosti, osobito u ekstremnim klimatskim uvjetima ili vremenskim prilikama, značajan je izazov.

Relativna vlažnost: Mikrovlažnost u posudi za rast biljaka, za koju se općenito očekuje da će doseći 98 % – 100 %, najznačajniji je faktor vlažnosti. Postoje dokazi da bi moglo biti učinkovitije održavati RH na 88 % – 94 % ili manje. To se može postići korištenjem manje medija po spremniku, većim koncentracijama sredstava za želiranje, filterima za izmjenu plina u posudama za rast i/ili održavanjem niže vlažnosti u prostoriji za uzgoj.

Svjetlo: Konvencionalni *in vitro* mediji za rast daju kulturama izvor ugljika, obično saharozu. Iako postoji određena fotosintetska aktivnost *in vitro*, biljke se ne oslanjaju na fotosintetsku fiksaciju ugljika za rast. Tradicionalno, fluorescentne svjetiljke bile su primarni izvor svjetlosti koji se koristi u mikropropagaciji. Gustoća fotona je između 20 i 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, sa standardnim fotoperiodom od 12 do 16 h. m^2

4.4. Prednosti i nedostaci mikropropagacije

Za mnoge vrste mikropropagacija nudi značajne prednosti u kvaliteti, količini i ekonomičnosti u odnosu na konvencionalno vegetativno razmnožavanje. Međutim, mikropropagaciji su svojstveni nedostaci i značajni nedostaci u znanju o tome kako kultura biljnog tkiva radi, a kako ne, i zašto. To se ne može zanemariti ako se želi povećati potencijal biljnih biotehnologija. Nastavlja se potraga za boljim metodama i povoljnijim ishodima u komercijalnoj mikropropagaciji.

4.4.1. Prednosti

Proizvodi se vrlo velik broj klonskih propagula u relativno kratkom vremenskom rasponu u odnosu na istu biljku korištenjem konvencionalnih tehnika [20]. Mikropropagacijom se vrši proizvodnja biljnog materijala bez bolesti s mogućnošću eliminacije virusne, bakterijske i gljivične kontaminacije. Primarni razlozi za korištenje mikropropagacije i *in vitro* tehnike su da pružaju važne alate za stvaranje i rad s eksplantatima i materijalom za razmnožavanje bez patogena. Osnovna postavka u komercijalnoj mikropropagaciji je sposobnost kontrole i jamčenja dosljedno visokog stupnja sličnosti između karakteristika izvorne biljke i konačnog biljnog proizvoda, bilo da se radi o veličini, obliku, boji cvijeta, prisutnosti i koncentraciji metabolita ili drugim karakteristikama. Tehnike mikropropagacije biljaka, integrirane u nove tehnologije, često predstavljaju sredstvo za brže i kvalitetnije rješavanje pitanja u hortikulturi te u poljoprivrednim, kemijskim, medicinskim i farmaceutskim znanostima. Mikropropagacija omogućava veću sposobnost sigurne isporuke velikih količina biljnog materijala brzo, učinkovito i relativno jeftino. Time se učinkovito eliminira ili minimizira udaljenost između istraživačkih i razvojnih centara te laboratorija.

4.4.2. Nedostaci

Nedostaci za komercijalnu primjenu mikropropagacije velikih su razmjera. Oni uključuju sljedeće probleme: česte mutacije, nedostatak osnovnog znanja o organogenezi ili embriogenezi, unutarnje infekcije, vitifikaciju i toksične eksudate, povećan etilen i CO₂ razine, zanemarivanje uloge fizičkih čimbenika rasta (svjetlo, temperatura, vlažnost i plinovita faza), gubitke pri prijenosu iz *in vitro* na aklimatizaciju, troškove rada i nedostatak realne mehanizacije, a mnoge novorazvijene tehnike nisu ekonomski isplative dok je komercijalna proizvodnja često nedovoljno kontrolirana. Neki od najvećih ekonomskih gubitaka, izravnih i neizravnih, u komercijalnoj mikropropagaciji uzrokovani su endogenom i ekološki izazvanom kontaminacijom biljnih kultura. Također, nastaju veliki gubici tijekom prijenosa biljnog materijala iz faze III. u fazu IV., fazu aklimatizacije. Uspjeh i održivost komercijalnog programa mikropropagacije temeljenog na kulturi tkiva ne mjeri se samo koeficijentom umnožavanja, nego i sposobnošću biljke da napravi prijelaz iz heterotrofnog/miksotrofnog *in vitro* sustava u fotoautotrofno stanje u stakleniku i polju. Skupa tehnologija, objekti i režijski troškovi te radno intenzivna priroda mikropropagacije često ju čine ekonomski neizvedivom i stvaraju troškove koji su neodrživi za određene biljke, sorte, proizvode ili tržišta.

5. PREGLED KULTURE STUDIJA *IN VITRO*

Ovo istraživanje provedeno je u cilju usporedbe različitih metoda mikropropagacije kako bi se odredila metoda koja je najpovoljnija za mikropropagaciju miskantusa.

Mnogi autori proučavali su i razvili nove biotehnološke metode reprodukcije miskantusa i razradu novih početnih oblika za poboljšanje genetske varijabilnosti. Prve detaljne informacije o *in vitro* kulturama na temelju proizvodnje kalusa *Miscanthus x giganteus* objavili su Lewandowski (1992.) i Lewandowski i Kahnt (1993. a, b, c). Prve rezultate mikropropagacije *in vitro* kultiviranjem objavio je Moller-Nielsen i sur. (1993).

U ovom radu napravljena je usporedba studija mikropropagacije morfogeneza *Miscanthus x giganteus* koju su objavili Klychenko i sur. (2018.), regeneracija biljaka *Miscanthus giganteus* - učinak tipova kalusa, starosti i načina uzgoja na sposobnost regeneracije koju su objavili Kim i sur. (2010.) te učinkovit i jednostavan *in vitro* sustav regeneracije *Miscanthus sinensis*, *M. x giganteus* i *M. sacchariflorus* za sadnju i biotehnološke svrhe, koju su objavili Ślusarkiewicz-Jarzina i sur. (2017.).

6. MATERIJALI I METODE

6.1. Morfogeneza *Miscanthus x giganteus in vitro* [22]

Materijal istraživanja bili su latentni pupovi trogodišnjih rizoma *Miscanthus x giganteus*. Za sterilizaciju je korištena 70-postotna otopina etanola i 0,1-postotna otopina HgCl₂. Eksplantati su sterilizirani 1,5 min u 70-postotnoj otopini etanola i 22 min u otopini od 0,1 % živinog biklorida uz naknadno ispiranje u tri obroka vode 7 - 10 min. Sterilni eksplantati stavljeni su u epruvete s 10 ml Murashige i Skoog (MS) nehormonskog medija za kulturu s naknadnim prijenosom u modificirani medij kulture MS: 1. MS + BAP⁸ (0,2 mg/l) + saharoza (30 mg/l) 2. MS + BAP (0,75 mg/l) i kinetin (1,2 mg/l) + saharoza (30 mg/l). Klince miskantusa ukorijenjene su u MS mediju, nadopunjenom polovičnom dozom makro- i mikroelemenata bez regulatora rasta. Eksplantati su uzgajani u prostoriji za kulturu na 23 – 25 °C, relativna vlažnost zraka 60 – 70 % i osvjetljenje 3000 lx, fotoperiod – 16 h. Biljke su prilagođene *in vivo* uvjetima u klimatskoj komori (Rubarth Apparate

⁸ BAP 6-benzilaminopurin/ benzil adenin

GmbH RUMED, Njemačka) korištenjem različitih mješavina tla: 1.) treset : pijesak : perlit (2 : 1 : 1), 2.) treset : pijesak (2 : 1), 3.) treset : perlit : tlo (2 : 2 : 1) na 24 – 25 °C uz relativnu vlažnost 70 – 80 %, intenzitet osvjetljenja 1.500 lx, fotoperiod – 16 h. Cilj rada bio je dobiti sadni materijal *Miscanthus* × *giganteus* u velikoj količini radi proučavanja osobitosti morfogeneze izolirane kulture meristema.

6.2. Regeneracija biljaka *Miscanthus* x *giganteus*: učinak tipova kalusa, starosti i načina uzgoja na sposobnost regeneracije [23]

Tkiva nezrelih cvatova, duljine približno 5 - 20 mm, sakupljena su iz biljaka *M. giganteus* uzgojenih u stakleniku i sterilizirana uranjanjem u otopinu NaOCl od 0,5 % tijekom 3 min. Sterilizirani eksplantati izrezani su na dijelove od 5 do 7 mm i stavljani na medij za indukciju kalusa (M1BA) koji se sastoji od bazalnih soli MS i MS vitamina (Murashige & Skoog, 1962.) s 2.4^{-D} (13,6 μM), BA (0,44 μM), 2,88 g L⁻¹ prolina, 30 g L⁻¹ saharoze i 750 mg L⁻¹ MgCl₂ 6H₂O, kako je opisao Petersen (1997). Svi mediji dopunjeni su s 2 g L⁻¹ Phytagelt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i podešeni na pH 5,5 prije autoklaviranja. Petnaest eksplantata postavljeno je na svaki medij za indukciju kalusa (M1BA) s 15 ponavljanja. Kulture su inkubirane u mraku na 27 ± 2 °C i subkulturirane u intervalima od 1 tjedna prva 2 tjedna, a zatim u intervalima od 2 tjedna tijekom 4 tjedna. Šest tjedana nakon početka kulture zabilježen je ukupan broj induciranih kalusa kako bi se izračunao postotak indukcije kalusa. Različite vrste kalusa razdvojene su po njihovom vizualnom izgledu i prebrojan je broj svake vrste kalusa. Klasifikacija kalusa bila je kako su opisali Lewandowski (1997.), Holme & Petersen (1996.) i Petersen (1997.) za procjenu kalusa *M. giganteus*. Jedna jedinica kalusa definirana je kao kalus promjera 2 mm. Postotak svake vrste kalusa izračunat je kao: postotak vrste kalusa 5 (broj svake vrste kalusa/ukupan broj komada kalusa) x 100.

6.3. Učinkovit i jednostavan *in vitro* sustav regeneracije *Miscanthus sinensis*, *M. × giganteus* i *M. sacchariflorus* za sadnju i biotehnoške svrhe [24]

Materijal za studije izveden je iz tri vrste *Miscanthus* i sastoji se od ukupno šest oblika koji dolaze iz dobro uhodane terenske zbirke Instituta za biljnu genetiku Poljske akademije znanosti. *In vitro* kulture započete su iz eksplantata prikupljenih u lipnju i kolovozu u ranoj fazi razvoja cvatova iz biljaka koje rastu u polju. Odrezani su distalni segmenti izdanaka dužine 10 - 20 cm, koji se sastoje od cvatova koji se razvijaju u lisnim ovojnica (duljine 0,5 - 3 cm) sa susjednim ulomkom izbojaka, zatim kratko očišćeni i sterilizirani u 5-postotnoj otopini kalcijevog hipoklorita 10 minuta i temeljito isprani u sterilnoj vodi. Zatim je lisna ovojnica uklonjena i izolirana su tri tipa eksplantata. Prilikom razvoja cvat je bio vrlo malen (0,5 – 1 cm), izrezan je u cjelini i, ako je bilo moguće, izrezan na 2 fragmenta (eksplantati nazvani 'cijeli u cvatovima'), slično eksplantatima koje su pokazali Głowacka i sur. U većem cvatu glavna os je secirana i izrezana na 2 – 10 fragmenata duljine 3 – 5 mm (eksplantati nazvani 'osovine cvatova'). U eksperimentu I. sve vrste eksplantata uzgajane su na bazalnom mediju MS s 30 gL^{-1} saharoze, dopunjene s $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP, a biljke iz induciranih kalusa su regenerirane na MS medij sa saharozom i $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP. U eksperimentu II. eksplantati tipa odabranog u 1. pokusu uzgajani su na MS s 30 gL^{-1} saharoze ili medija C17 modificiranog zamjenom saharoze s 90 gL^{-1} maltoze. Mediji su dopunjeni jednom od sljedećih kombinacija regulatora rasta: $4,0, 5,0$ ili $6,0 \text{ mgL}^{-1}$ 2,4-D + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ BAP ili KIN, dok je regeneracija sadnica provedena kao u pokusu I. U pokusu III. kalusi su inducirani iz eksplantata tipa odabranog u 1. pokusu na mediju uspostavljenom u 2. pokusu, ali su sadnice regenerirane na sljedećem mediju, sve dopunjeno s 30 gL^{-1} saharoze i regulatorima rasta: MS s $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ BAP, MS s $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ NAA⁹ + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ KIN ili 190-2 medij s $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ NAA + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ KIN. Medij korišten u svim pokusima podešen je na pH 5,7 i skrućivan s 0,7-postotnim agarom. Kalus se formirao na $24 \text{ }^\circ\text{C}$ u mraku 2 mjeseca. Zatim su kalusi izrezani iz originalnih eksplantata i premješteni na regeneracijski medij. Naknadno su preneseni na isti svježiji medij svaka 3 - 4 tjedna.

⁹ 1-naftalenoctena kiselina

Cjelokupna regeneracijska kultura, uključujući razvoj sadnica, rast i ukorjenjivanje, provedena je na 22 °C u fotoperiodu od 16 sati.

7. REZULTATI I RASPRAVA

7.1. Morfogeneza *Miscanthus × giganteus in vitro* [22]

Studije su pokazale da je najveći postotak starosti sterilnih latentnih pupova (70 %) postignut dosljednim držanjem u 70-postotnoj otopini C2 H5 OH, etanolu (1,5 min) uz daljnji prijenos u otopinu HgCl₂ od 0,1 % (22 min) i ispiranje tri puta u sterilnoj destiliranoj vodi. Izvađeni latentni pupovi počeli su se povećavati 5. – 6. dan nakon sadnje u medij kulture, a 8. – 10. dana preneseni su u medij kulture MSR1 i MSR2. Učinkovitost odabranih medija procijenjena je sljedećim indeksima: duljina klica, njihov broj i učestalost višestruke obrade. Mjerenja morfometrijskih indeksa i izračuni kvantitativnih podataka vršeni su tijekom 30 dana (tablica 3.).

Tablica 3: Utjecaj sastava podloge na razvoj meristemskih kultura *Miscanthus x giganteus* [22]

| Broj medija kulture | Sastav medija | Dužina klice, mm | Broj klica | Koeficijent reprodukcije |
|---------------------|---|------------------|--------------|--------------------------|
| MSR1 | MS + BAP (0.2 mg/l) + saharoza (30 mg/l) | 4.6 ± 0.9 | 2.8 ± 0.5 | 4.6 ± 1.1 |
| MSR2 | MS + BAP (0.75 mg/l) i kinetin (1.2 mg/l) + saharoza (30 mg/l) | 13.3 ± 1.0 | 5.2 ± 0.6 | 11.4 ± 1.2 |

Izvor: Autor

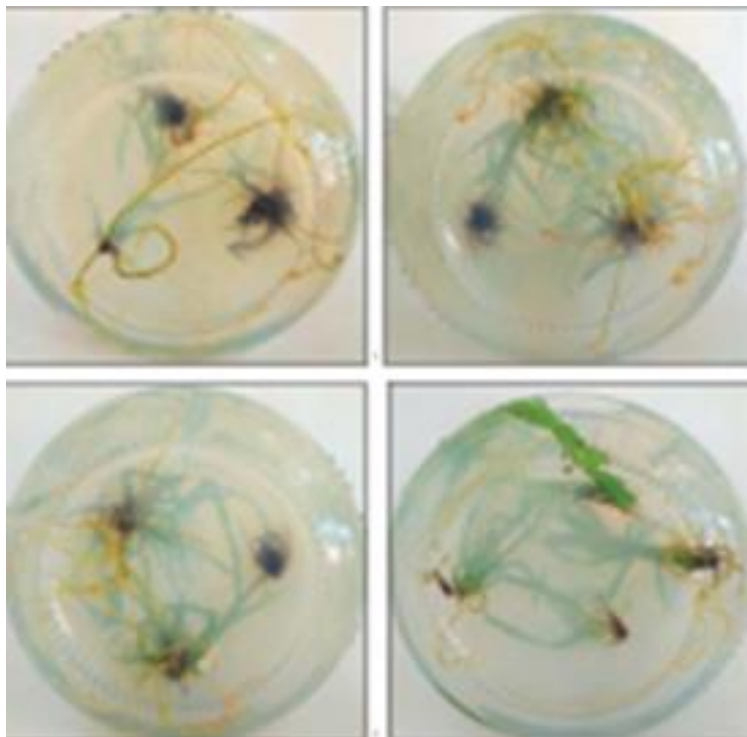
Tijekom prva tri tjedna uzgoja procesi regeneracije u izoliranim biljkama miskantusa bili su najaktivniji u prisutnosti veće količine BAP-a i kinetina. Prema zapažanjima, kinetin (1,2 mg/l) pospješuje stvaranje pupova i dodatnih klica. Poznata je znanstvena činjenica da su neki citokini sposobni ukloniti apikalnu dominaciju i dovesti do buđenja pomoćnih pupova. U ovom istraživanju dodatkom BAP-a (0,75 mg/l) došlo je do aktivnog stvaranja 3 - 7 dodatnih klica u 4. - 5. tjednu uzgoja. Treba napomenuti da je saharoza (30 mg/l) u ovoj fazi uzgoja izoliranih eksplantata povoljan izvor ugljikohidrata. Istraživanja su pokazala da je optimalni medij kulture za regeneraciju mikroglija MSR2, dopunjen s BAP (0,75 mg/l) i kinetinom (1,2 mg/l). Ovdje je učestalost regeneracije klica iznosila 90,0 – 100,0 % s razvojem glavne klice i višestrukim bušenjem s učestalošću od 85,0 – 100,0 % (Sl.12).



Slika 12: Uzgoj klica miskantusa na podlozi različitog sastava (a- MSR1, b- MSR2) [22]

Važno je napomenuti proces rizogeneze. Ukorjenjivanje klica *Miscanthus × giganteus* *in vitro* ovisilo je o veličini klice i broju provedenih pasaža. Klice duge 5 – 6 cm (stare 8 – 9 tjedana) prebačene su u medij za kulturu MS s polovičnom dozom makro- i mikroelemenata bez regulatora rasta. Biljke *Miscanthus × giganteus* pokazale su svoju

spособnost normalnog razvoja u ovom mediju kulture. Formiranje korijenskog sustava uočeno je 8. - 11. dana uzgoja (slika 13).



Slika 13: Rizogeneza *Miscanthus x giganteus* [22]

Nakon formiranja korijenskog sustava laboratorijske biljke počele su aktivno rasti, udvostručiti se, pa čak i utrostručiti u roku od 7 dana uz aktivno formiranje listova. Po jednoj klici dobivalo se u prosjeku 4 - 10 korijena od 1,5 cm. Tridesetog (30.) dana uzgoja broj korijena bio je u rasponu od 9 do 22, a njihova duljina od 4 do 13 cm (tablica 4). Učestalost ukorjenjivanja bila je 95,0 – 97,0 %. Laboratorijske biljke stare 12 - 14 tjedana (ovisno o razdoblju uzgoja u podlozi za ukorjenjivanje) mogu se dalje uzgajati u stakleniku. Regenerirane biljke od 5 do 7 cm s dobro razvijenim korijenovim sustavom pažljivo su izvađene pincetom, korijenje im je temeljito isprano iz podloge (kako bi se spriječilo truljenje i propadanje biljaka) te je posađeno u različite supstrate.

Tablica 4: Ukorjenjivanje *Miscanthus x giganteus* in vitro [22]

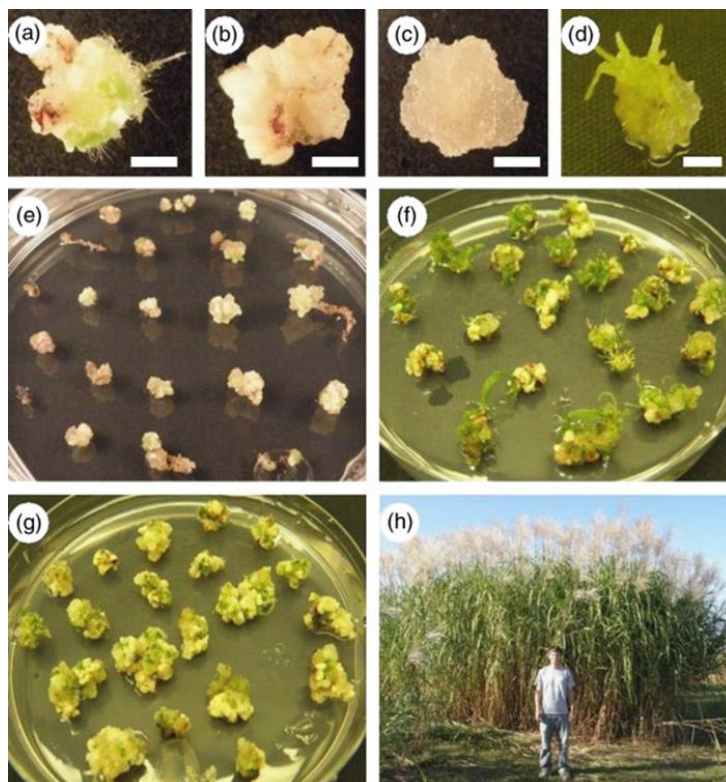
| Dan | Prosječan broj korijena po biljci | Prosječna duljina korijena, cm |
|-----|-----------------------------------|--------------------------------|
| 10 | 6.3 ± 0.3 | 1.5 ± 0.07 |
| 20 | 10.5 ± 0.5 | 4.3 ± 0.2 |
| 30 | 14.1 ± 0.7 | 9.6 ± 0.5 |
| 10 | 6.3 ± 0.3 | 1.5 ± 0.07 |

Izvor: Autor

Laboratorijske biljke stare 12 - 14 tjedana (ovisno o razdoblju uzgoja u podlozi za ukorjenjivanje) mogu se dalje uzgajati u stakleniku. Regenerirane biljke od 5 do 7 cm s dobro razvijenim korijenovim sustavom pažljivo su izvađene pincetom, korijenje im je temeljito isprano iz podloge (kako bi se spriječilo truljenje i propadanje biljaka) i posađene su u različite supstrate. Evidentno je da se supstrat br. 1 pokazao najučinkovitijim za biljku miskantus jer je, za razliku od supstrata br. 2 i 3, poticao brzo ukorjenjivanje, rast i razvoj klica. Četiri tjedna kasnije na biljkama je došlo do formiranja 3 - 4 lista i mliječnog korijenovog sustava. U tim uvjetima preživljavanje mikrobiljki iznosilo je 91 – 95 %.

7.2. Regeneracija biljaka *Miscanthus giganteus*: učinak tipova kalusa, starosti i načina uzgoja na sposobnost regeneracije [23]

Eksplantati nezrelih cvatova započeli su kalus oko 2 tjedna nakon kulture na M1BA mediju koji je sadržavao 13,6 mM 2,4-D¹⁰ i 0,44 mM BA¹¹ s učestalošću od $78 \div 7,8$ % mjereno 6 tjedana nakon inicijacije. Tri različite vrste kalusa identificirane su nakon 6 tjedana kulture (slika 14 a - c).



Slika 14: Regeneracija biljaka iz kalusa miskantusa [23]

Dominantni tip kalusa (41 ± 4 % od ukupnog broja) bio je žuti ili bijeli zbijeni kalus sa svijetlozelenim strukturama (kalus koji stvara izdanak) (slika 14a). Postoci kompaktnog, bijeloga kalusa (kalusa nalik embriogenom) (slika 14b) i mekog, trošnoga kalusa (slika 14c) iznosili su $22 \pm 2,1$ odnosno $37 \pm 3,7$ %. Utvrđeno je da je kontinuirana subkultura kalusa koji stvaraju mladice na M1BA čvrstom indukcijskom mediju kalusa uzrokovala da većina kalusa promijeni boju u smeđu. Održavanje kalusa koji stvaraju izbojke na čvrstom mediju koji sadrži samo 2,4-D uglavnom proizvodi žučkasti i polumekani kalus

¹⁰ 2,4- diklorofenoksiocetna kiselina

¹¹ benziladenin

s malim dijelom embriogenog tipa kalusa. Kalus koji stvara izdanak održavan u tekućem mediju također se pretvorio u žućkasti i polumeki kalus, a većina je tada formirala korijenje na regeneracijskome mediju (slika 1d). Najbolje su se pokazale jednomjesečne mladice koje stvaraju klice. Nakon 1 mjeseca subkulture na čvrstom mediju za održavanje kalusa procijenjena učestalost regeneracije kalusa koji tvore izbojke pala je na 0,3 odnosno 0,1 sadnice po kalusu na mediju za regeneraciju MR1-1 i MR1-2. Eksperimentalni podaci pokazali su da su tipovi i starost kalusa induciranih iz nezrelih tkiva cvatova kritični čimbenici koji određuju učinkovitost regeneracije sadnica u *M. giganteus*. Kalusi koji tvore izbojke inducirani iz nezrelih tkiva cvatova pokazali su najveću učestalost regeneracije u ovom eksperimentu. Zabilježeno je da se regeneracija biljaka poboljšala korištenjem kalusa koji stvara izbojke inducirano iz listova i vrhova izdanaka *M. giganteus*. Kombinacija 2,4-D i BA u mediju za indukciju kalusa bila je učinkovita za poboljšanje regeneracije biljaka, kao i induksijske frekvencije kalusa koji stvara mladice kod *M. giganteus*. Preliminarni eksperimenti provedeni regeneracijom kalusa induciranih iz nezrelih tkiva cvata sa ili bez BA također su pokazali veće frekvencije regeneracije iz kalusa inducirano 2,4-D i BA od kalusa inducirano samo 2,4-D. Gubitak sposobnosti regeneracije s povećanjem starosti kalusa kritičan je problem za održavanje i regeneraciju kalusa kod *M. giganteus*, što je uočeno i za druge vrste trava. Holme i suradnici (1997.) uspostavili su sustav suspenzijske kulture za održavanje embriogenih kultura kalusa u *M. giganteus*, a visoka učinkovitost regeneracije postignuta je iz suspenzijskih agregata starih 18 mjeseci. Ovi eksperimenti potvrdili su da se sposobnost regeneracije kulture kalusa nalik embriogenom može održavati tijekom dugotrajne kulture u razdoblju (do 1 godine) suspenzijskom kulturom. Nadalje, procijenjeno je kako dva regulatora rasta slična auksinu, NAA ili 2,4-D, utječu na učinkovitost brzine regeneracije iz kalusa koji stvara mladice. Kombinacija NAA i BA u regeneraciji medija (MR1-1 medij) stimulirala je brzu regeneraciju izbojaka i rast iz kalusa koji stvaraju izbojke u usporedbi s kombinacijom 2,4-D i BA (medij MR1-2) (tablica 5). Učestalost regeneracije kalusa koji stvaraju mladice na mediju MR-1 bila je značajno viša od frekvencije.

Tablica 5: Utjecaj dvaju različitih medija za regeneraciju (MR1-1 i MR2-2) na brzu regeneraciju iz kalusa starih 6 tjedana [23]

| Frekvencija regeneracije | | | |
|---------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Medij | Nakon 1 mjesec inkubacije*,§ | Nakon 2 mjeseca inkubacije w,§ | Ukupna frekvencija z,§ |
| MR1-1 (1.3 mM NAA i 22 mM BA) | 0.84 ± 0.8a | 0.35 ± 0.08a | 1.19 ± 0.15a |
| MR1-2 (4.5 mM 2,4-D i 22 mM BA) | 0.29 ± 0.05b | 0.54 ± 0.07a | 0.83 ± 0.08b |

Izvor: Autor

*Učestalost regeneracije procijenjena je kao broj regeneriranih sadnica podijeljen s ukupnim brojem kalusa nakon 1 mjeseca inkubacije na regeneracijskom mediju bez subkulture (testirano je 20 kalusa za svaki tretman s pet ponavljanja).

w Nakon vađenja regeneriranih sadnica iz materijala kalusa u prvom mjesecu kalusi su subkulturirani i inkubirani na regeneracijskom mediju još jedan mjesec, a zatim je prebrojan broj regeneriranih sadnica.

z Za procjenu ukupne učestalosti regeneracije korišten je ukupan broj regeneriranih biljaka za 2 mjeseca inkubacije kalusa na mediju za regeneraciju.

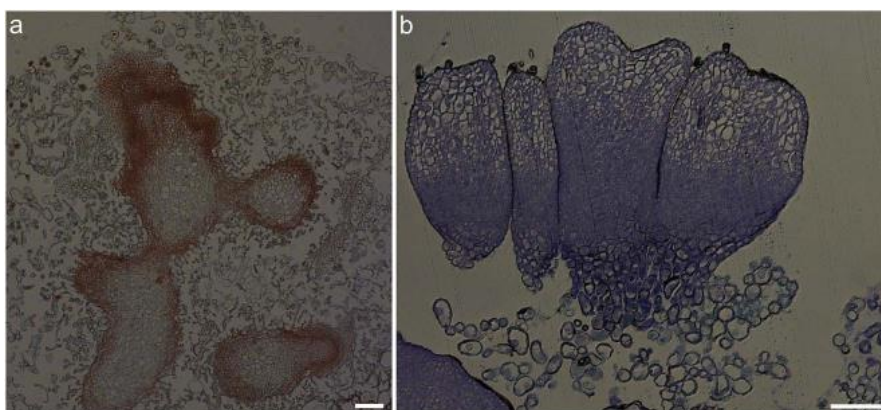
§ Sredstva unutar svakog stupca s različitim slovima značajno se razlikuju na Pf0.05, koristeći Fisherov LSD.

Učestalost dobivena iz medija MR1-2 tijekom prvog mjeseca inkubacije bila je značajno manja nego na mediju MR1-1, a ukupan broj regeneriranih biljaka dobiven nakon 2 mjeseca inkubacije na regeneracijskom mediju također je bio značajno veći na mediju MR1-1 nego što je bio na mediju MR1-2. Većina regeneriranih sadnica (69 % od ukupno regeneriranih sadnica) pojavila se unutar 1 mjeseca od inkubacije u mediju MR1-1, dok je u istom razdoblju na mediju MR1-2 proizvedeno samo 30 % od ukupnog broja regeneriranih sadnica. Slike 1f i g snimljene su nakon trotjedne inkubacije klica koje stvaraju mladice te je vidljiva izrazita razlika u regeneraciji i rastu izdanaka na ova dva različita medija. Kalusi koji tvore izbojke postavljeni na MR1-2 medij formirali su mnoge zelene mrlje koje ukazuju na početak diferencijacija kalusa s nekoliko sićušnih višestrukih izdanaka na površini kalusa tijekom 3 tjedna (slika 14g), ali rast diferenciranih izbojak bio je relativno spor u usporedbi s regeneriranim izbojcima na mediju MR1-1 (slika 14f).

Čini se da je fina selekcija i održavanje kompaktnog, bijelog nodularnog tipa kalusa također važan čimbenik koji utječe na učinkovitost regeneracije kultura kalusa sličnih embriogenim. Regenerirane biljke uzgojene u polju pokazale su normalan fenotipski razvoj s visinama biljaka i promjerom stabljike usporedivim s biljkama razmnožavanim rizomom u našim pokusima. Sadnja zrelih rizoma uzgojenih oko 3 mjeseca u stakleniku ili vani bez podjele može ubrzati rast i razvoj regeneriranih biljaka *M. giganteus*.

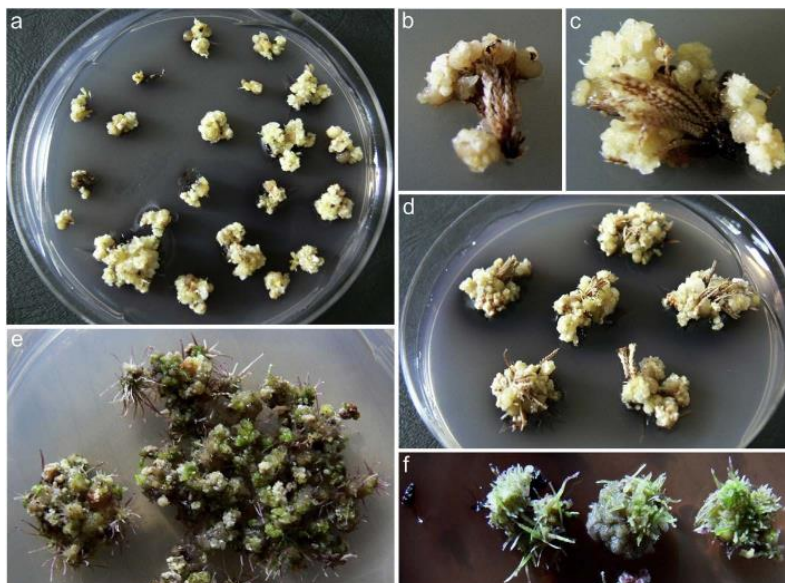
7.3. Učinkovit i jednostavan *in vitro* sustav regeneracije *Miscanthus sinensis*, *M. × giganteus* i *M. sacchariflorus* za sadnju i biotehnoške svrhe [24]

Embriogeni kalus dobiven je iz svih tipova eksplantata šest genotipova miskantusa testiranih u pokusu I. Somatska embriogeneza započeta je u vrlo ranim fazama rasta kalusa, a globularni i polarizirani embriji uočeni su oko 3 - 4 tjedna nakon prijenosa eksplantata na medij za indukciju kalusa (Sl. 15a). Somatski embriji često su se razvijali u skupinama kao različite bipolarne jedinice s jednostaničnim slojem epiderme, labavo pričvršćenim na površinu kalusnog tkiva (slika 15b).



Slika 15: Histološki razvoj somatskog embrija u kalusu iz mladog cvata genotipa *M. sinensis* 17 nakon 1 mjeseca kulture [24]

Kalus je varirao u strukturi i izgledu, ovisno o vrsti eksplantata, a donekle i o genotipu. Kalus svih testiranih genotipova *Miscanthusa*, koji potječe iz cijelih nezrelih cvatova, razvio se kao žućkaste i tvrde kvržice, s nekim mekim dijelovima i malim bijelim zbijenim grozdovima (sl. 16a – d). Uzgoj eksplantata dobiven iz osi fluorescencije, posebno *M. sacR*, također je razvio žućkasti i nodularni kalus s bijelim grozdovima, ali lomljiviji i djelomično rizogeniji. Čvorovi su formirali mali polumeki kalus s nekim grozdovima. Ubrzo nakon prelaska na svjetlosne uvjete embriogene strukture postale su zelene i razvile su se u biljčice (slika 16e – f).



Slika 16: Indukcija kalusa različitih genotipova miskantusa [24]

Regeneracija sadnica iz preostalog kalusa nije uočena. Genotip i tip eksplantata značajno su utjecali na indukciju kalusa i kasniju regeneraciju sadnica. Cijeli su cvatovi bili visoki, a čvorovi najniži. Regeneracija sadnica ovisila je o podrijetlu kalusa. Za većinu genotipova najveći PRR¹² zabilježeni su za kalus formiran od cijelih nezrelih cvatova praćenih osima cvatova (beznačajna razlika). Čvorovi su općenito proizveli neproduktivne eksplantate, osim genotipova Ms16 i Mxg4. Osim MsacR-a, genotipovi miskantusa otkrili su sličan PRR, ali je ovaj proces u različitoj mjeri odgovarao stvaranju kalusa za pojedine genotipove. Stoga je rezultirajuća ukupna učinkovitost regeneracije (TRE¹³), koja je odražavala međusobni utjecaj uvjeta indukcije kalusa i regeneracije sadnica, usvojena kao mjera stvarnoga kapaciteta regeneracije za odabir genotipova i eksplantata koji najviše reagiraju.

Pokus II bio je usredotočen na optimizaciju medija za indukciju kalusa i njegov učinak na kasniji razvoj sadnica pa je stoga uspoređeno 12 varijanti koje su sadržavale dva bazalna medija MS i C17 sa šest različitih kombinacija regulatora rasta. Uočen je zamjetan pad oba procesa u usporedbi s analognom varijantom pokusa I, vjerojatno zbog toga što su uvjeti rasta na polju u sljedećoj sezoni utjecali na konstituciju biljaka i regeneracijski kapacitet sakupljenih eksplantata. Ipak, uočene su slične tendencije u oba procesa kao i ranije. Genotip miskantusa, zajedno s podlogom i regulatorima rasta,

¹² PRR stopa indukcije sadnica

¹³ TRE ukupna učinkovitost regeneracije

značajno je utjecao na indukciju kalusa i regeneraciju sadnica. Među ispitanim regulatorima rasta, srednja koncentracija 2,4-D – 5,0 mg l⁻¹ najučinkovitije je stimulirala rast kalusa u oba medija, a također je utvrđeno da je BAP imao veću aktivnost od KIN-¹⁴ (tablica 6).

Tablica 6: Učinak medija i kombinacije regulatora rasta na stopu indukcije kalusa (CIR) odabranih genotipova i eksplantata miskantusa [24]

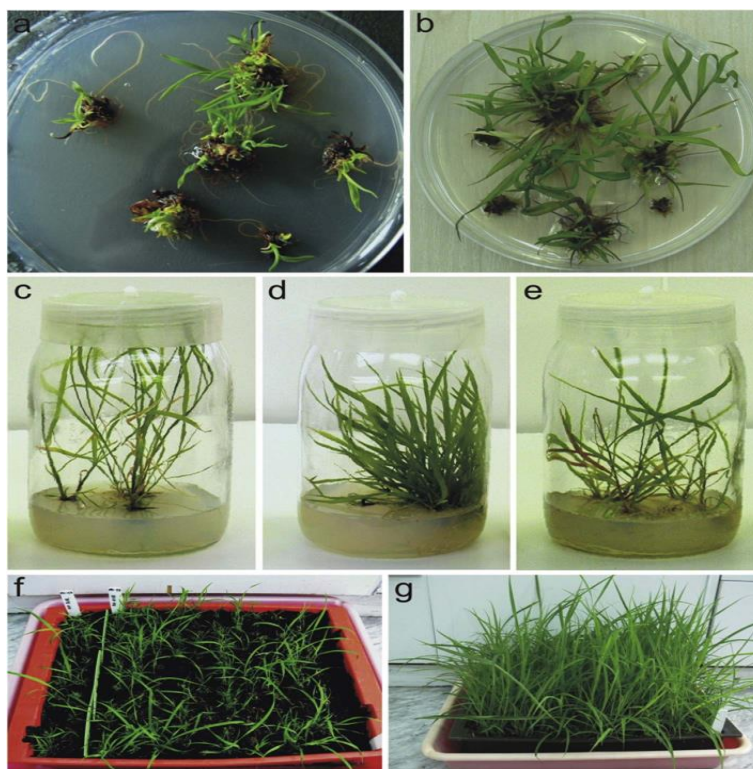
| Vrsta i genotip | M. sinensis | | M. × giganteus | | M. sacchariflorus | | |
|---|-------------|-------------|----------------|----------|-------------------|--------------|-------------|
| | MS | C17 | MS | C17 | MS | dC17 | |
| Regulatori rasta [mg l ⁻¹] | Medij | | | | | | |
| 4.0 2,4-D + 0.5 BAP | 112.2 cd | 237.4 b | 123.8 d | 246.7 b | 135.6 c | 178. 9 bc | 172.4 c |
| 5.0 2,4-D + 0.5 BAP | 230.0 a | 390.0 a | 259.0 a | 317.9 a | 192.0 a | 200. 0 a | 264.8 a |
| 6.0 2,4-D + 0.5 BAP | 201.7 b | 371.2 a | 145.0 c | 288.0 a | 154.8 b | 187. 5 ab | 224.7 b |
| 4.0 2,4-D + 0.5 KIN | 101.6 d | 156.9 d | 112.7 d | 164.3 d | 117.3 d | 156. 3 d | 134.9 d |
| 5.0 2,4-D + 0.5 KIN | 123.7 c | 190.2 c | 198.1 b | 197.2 c | 127.4 cd | 176. 6 bc | 168.9 c |
| 6.0 2,4-D + 0.5 KIN | 109.8 cd | 178.0 cd | 180.2 b | 179.1 cd | 119.8 d | 170. 2 c | 156.2 cd |
| | 146.5 c | 254.0 a | 169.8 bc | 232.2 a | 141.2 c | 178. 3 b | |

Izvor: Autor

¹⁴ KIN, kinetin

Optimalna kombinacija 2,4-D i BAP-a za indukciju kalusa također je imala pozitivan utjecaj na kasniju regeneraciju sadnica, iako beznačajan. Ipak, korištenje medija C17 umjesto MS imalo je sinergistički i značajno pozitivan učinak na indukciju kalusa, kao i neizravno na biljku. Predstavljena studija je pokazala da je učinkovitost embriogenih indukcija kalusa odredila cijeli proces regeneracije *miskantusa*. Uočili smo značajnu raznolikost učinkovitosti indukcije kalusa među vrstama i genotipovima *miskantusa*. *M. sinensis* i *M. × giganteus* pokazao je veći morfo-genetski kapacitet od *M. sacchariflorus*. Rezultati općenito odgovaraju drugim izvješćima, gdje su uglavnom istraživani *M. × giganteus* ili *M. sinensis*, ali ponekad je nekoliko vrsta i/ili genotipova tretirano u istom pokusu. Tamo su *M. sinensis*, *M. × giganteus* i *M. sacchariflorus* i/ili njihovi odgovarajući genotipovi ili pokazali sličnu sposobnost stvaranja kalusa ili su se u tom pogledu značajno razlikovali. Ovdje smo potvrdili usporedive stope indukcije kalusa za *M. × giganteus* i *M. sinensis*, koje su bile 2 - 3 puta veće nego za *M. sacchariflorus*. Međutim, formiranje kalusa i uzastopni razvoj sadnica značajno su ovisili o genotipu (tablice 1. i 2.). Među genotipovima *M. sinensis* i *M. × giganteus* najveće stope indukcije kalusa zabilježene su za Ms17 i Mxg4, koje su značajno premašile - i do nekoliko puta - njihove srodne genotipove.

Utjecaj medija i regulatora rasta na regeneraciju biljaka u stvaranju inducirano kalusa proučavan je u eksperimentu III. Učinkovitost ovog procesa značajno je ovisila o genotipu *miskantusa* i mediju za rast kulture. Dobivene biljčice (sl. 4a - b) bile su zelene i dobro su se dalje razvijale. Izdužile su se i spontano formirale nakupine koje su se mogle dalje podijeliti, obično u 3 - 10, a ponekad i do 20 klonova (slika 4b - e). Svi koraci kulture sadnica provedeni su na istome mediju, a konačno ukorijenjene sadnice prebačene su u tlo i kultivirane u komori za rast (slika 4f - g). Cijeli proces regeneracije trajao je oko 4 - 5 mjeseci.



Slika 17: Regeneracija biljaka različitih genotipova miskantusa na mediju 190-2 nadopunjen s 0.5 mg/L NAA i 0.5 mg/L KIN i prilagodba ex vitro uvjetima [24]

Razvoj učinkovitog sustava regeneracije potreban je i za *Miscanthus sinensis*, *M. × giganteus* i *M. sacchariflorus*. *M. × giganteus* smatra se najvažnijom vrstom miskantusa zbog svoje dominantne uloge u proizvodnji biomase. Štoviše, sve ove vrste mogu se koristiti i za druge primjene kao što je fitoremedijacija, dok su jednako važne u genetskom i uzgojnom istraživanju. Rezultati ovog eksperimenta općenito odgovaraju drugim izvješćima, gdje su uglavnom istraživani *M. × giganteus* ili *M. sinensis*, ali su i pokazali da *M. sinensis*, *M. × giganteus* i *M. sacchariflorus* i/ili njihovi odgovarajući genotipovi imaju sličnu sposobnost stvaranja kalusa. Ovim eksperimentom potvrđene su usporedive stope indukcije kalusa za *M. × giganteus* i *M. sinensis*, koje su bile 2 - 3 puta veće nego za *M. sacchariflorus*.

8. ZAKLJUČAK

Jedan od prioriteta svih civiliziranih naroda je osiguranje razvoja bioenergije, zaštita prirodnih resursa i potraga za novim i alternativnim izvorima energije. Posljednjih godina vlada veliki interes za novu kulturu, miskantus. Različiti genotipovi miskantusa razmnožavaju se diobom rizoma ili mikropropagacijom *in vitro*. Iako postoje brojna izvješća o *in vitro* kulturi *M. x giganteus* (Lewandowski 1997.; Holme i Petersen 1996.; Holme i sur., 1997; Petersen 1997.; Petersen et al., 1999.), još uvijek nema utvrđene ili preporučene kulture *in vitro* metode prikladne za komercijalnu proizvodnju mikropropagacije miskantusa. Metoda mikropropagacije osigurava nekoliko puta veći broj sadnica iz jednog eksplantata nego što to omogućava razmnožavanje pomoću rizoma. Zbog svega navedenog mnogi ljudi smatraju da je miskantus gorivo budućnosti.

Prioriteti za povećanje važnosti tehnika mikropropagacije u ovom stoljeću zahtijevaju rješavanje nekih složenih izazova. Smanjenje troškova jasan je zahtjev za širu primjenu mikropropagacije u raznim važnim komercijalnim vrstama koje se koriste u poljoprivredi, hortikulturi i šumarstvu. Ostali prioriteti uključuju povećanje učinkovitosti tehnika mikrorazmnožavanja kako bi se smanjili glavni troškovi koji nastaju tijekom mikropropagacije sadnica.

Različite vrste miskantusa, proizvedene kulturom *in vitro*, zahtijevaju mnogo veće troškove uspostavljanja kultura ove biljke, od oko 3000 - 6000 € (2730 - 5460 USD) po hektaru za tipične gustoće od jedne ili dvije biljke po četvornome metru. Troškovi biljnih propagula i potreba za razmnožavanjem velikog broja biljaka ključni su čimbenici koji ograničavaju rasprostranjenu sadnju miskantusa. Mikropropagacija bi mogla omogućiti brzo umnožavanje početnih zaliha germplazme odabranih u programima uzgoja. Ti bi se materijali potom podvrgli razmnožavanju rizoma kako bi se ispunili zahtjevi velike proizvodnje na terenu. Sve veći zahtjevi za uzgojem miskantusa u različitim regijama i zemljama zahtijevaju poboljšanje trenutačnih tehnika mikropropagacije kulture tkiva kako bi se smanjili troškovi razmnožavanja i povećala dostupnost mikropropagacije za šire upotrebe. Mikropropagacija biljke miskantus jako je važna tehnika za uzgojne svrhe u budućnosti jer nudi raznolik raspon prednosti u usporedbi s ograničenjima uobičajenih i prirodnih reproduktivnih barijera u konvencionalnim tehnikama uzgoja.

9. LITERATURA

- [1] Zheng, Cheng, et al. "“Two-steps” seed-derived plugs as an effective propagation method for the establishment of *Miscanthus* in saline–alkaline soil." *GCB Bioenergy* 13.6 (2021): 955-966.
- [2] Pravilnik o popisu biljnih vrsta za osnivanje drvenastih kultura kratkih ophodnji te načinu i uvjetima pod kojima se mogu uzgajati. NN 16/2019
- [3] Clifton-Brown, John, et al. "Progress in upscaling *Miscanthus* biomass production for the European bio-economy with seed-based hybrids." *Gcb Bioenergy* 9.1 (2017): 6-17.
- [4] Lewandowski, Iris, et al. "*Miscanthus*." *Perennial Grasses for Bioenergy and Bioproducts*. Academic Press, 2018. 35-59.
- [5] Ivanyshyn, Volodymyr, et al. "Prospects of growing miscanthus as alternative source of biofuel." *Renewable Energy Sources: Engineering, Technology, Innovation*. Springer, Cham, 2018. 801-812.
- [6] Yang, Sai, et al. "Genetic diversity and population structure of *Miscanthus lutarioriparius*, an endemic plant of China." *PloS one* 14.2 (2019): e0211471.
- [7] Kiesel, Andreas, Moritz Wagner, and Iris Lewandowski. "Environmental performance of miscanthus, switchgrass and maize: Can C4 perennials increase the sustainability of biogas production?." *Sustainability* 9.1 (2016): 5
- [8] Bilandžija i sur 2017
- [9] Waldmann, Danièle, et al. "Masonry blocks from lightweight concrete on the basis of *Miscanthus* as aggregates." *Perennial Biomass Crops for a Resource-Constrained World*. Springer, Cham, 2016. 273-295.
- [10] Iqbal, Y., and I. Lewandowski. "Biomass composition and ash melting behaviour of selected miscanthus genotypes in Southern Germany." *Fuel* 180 (2016): 606-612.
- [11] Van der Weijde, Tim, et al. "Evaluation of *Miscanthus sinensis* biomass quality as feedstock for conversion into different bioenergy products." *Gcb Bioenergy* 9.1 (2017): 176-190.
- [12] Mangold, Anja, et al. "“Collar propagation” as an alternative propagation method for rhizomatous miscanthus." *GCB Bioenergy* 10.3 (2018): 186-198.
- [13] Kiesel, Andreas, and Iris Lewandowski. "*Miscanthus* as biogas substrate—Cutting tolerance and potential for anaerobic digestion." *Gcb Bioenergy* 9.1 (2017): 153-167.
- [14] Frydendal-Nielsen, Susanne, et al. "The effect of harvest time, dry matter content and mechanical pretreatments on anaerobic digestion and enzymatic hydrolysis of miscanthus." *Bioresource technology* 218 (2016): 1008-1015.

- [15] Lewandowski, Iris, et al. "Progress on optimizing miscanthus biomass production for the European bioeconomy: Results of the EU FP7 project OPTIMISC." *Frontiers in plant science* 7 (2016): 1620
- [16] Milčić, Nevena, Z. Findrik Blažević, and M. Vuković Domanovac. "Fitoremedijacija-pregled stanja i perspektiva." *Kemija u Industriji* 68 (2019).
- [17] Gopalakrishnan, Gayathri, M. A. R. I. A. Cristina Negri, and William Salas. "Modeling biogeochemical impacts of bioenergy buffers with perennial grasses for a row-crop field in Illinois." *Gcb Bioenergy* 4.6 (2012): 739-750.
- [18] Korzeniowska, Jolanta, and Ewa Stanislawski-Glubiak. "Phytoremediation potential of *Miscanthus× giganteus* and *Spartina pectinata* in soil contaminated with heavy metals." *Environmental Science and Pollution Research* 22.15 (2015): 11648-11657.
- [19] Barbosa, Bruno, et al. "Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils using the perennial energy crops *Miscanthus* spp. and *Arundo donax* L." *BioEnergy Research* 8.4 (2015): 1500-1511.
- [20] Gupta, Nikita, et al. "A review on micropropagation culture method." *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development* 8.1 (2020): 86-93.
- [21] Cardoso, Jean Carlos, Lee Tseng Sheng Gerald, and Jaime A. Teixeira da Silva. "Micropropagation in the twenty-first century." *Plant cell culture protocols* (2018): 17-46.
- [22] Klyachenko, O., O. Nekrut. "Morphogenesis of *Miscanthus× Giganteus* in vitro." *Agricultural Science and Practice* 5.2 (2018): 13-17
- [23] Kim, Hyoung Seok, et al "Miscanthus× giganteus plant regeneration: effect of callus types, ages and culture methods on regeneration competence." *Gcb Bioenergy* 2.4 (2010): 192-200
- [24] Ślusarkiewicz-Jarzina, Aurelia, et al. "Effective and simple in vitro regeneration system of *Miscanthus sinensis*, *M.× giganteus* and *M. sacchariflorus* for planting and biotechnology purposes." *Biomass and Bioenergy* 107 (2017): 219-226.
- [25] Atkinson, Christopher J. "Establishing perennial grass energy crops in the UK: A review of current propagation options for *Miscanthus*." *Biomass and bioenergy* 33.5 (2009): 752-759.
- [26] Chen, Chang-Lin, et al. "Genetic diversity of salt tolerance in *Miscanthus*." *Frontiers in plant science* 8 (2017): 187.
- [27] Dierking, Ryan M., et al. "Nitrogen reserve pools in two *Miscanthus× giganteus* genotypes under contrasting N managements." *Frontiers in Plant Science* 8 (2017): 1618
- [28] Geršić, Anja. Energetske karakteristike trave *Miscanthus x giganteus* ovisno o gnojidbenom tretmanu i roku žetve. Diss. University of Zagreb. Faculty of Agriculture. Department of General Agronomy, 2016.

[29] Holme, Inger Bæksted, and Karen Koefoed Petersen. "Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45.1 (1996): 43-52.

[30] Ikanović, Jela, et al. "Miscanthus biomass production growth on degraded land." *Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik* 21.1-2 (2015): 115-123.

[31] Jakšić, Katarina. *Usporedba teorijskih i empirijskih ogrjevnih vrijednosti miskantusa*. Diss. University of Zagreb. Faculty of Agriculture. Department of Agricultural Technology, Storage and Transport, 2019.

10. POPIS SLIKA

| | | |
|---|--|----|
| Slika 1: Zemljopisna rasprostranjenost glavnih vrsta miskantusa [4] | 11 | |
| Slika 2: Terenske parcele s različitim genotipovima miskantusa na pokusnoj poljskoj postaji „Ihinger Hof“, južna Njemačka [4] | 17 | |
| Slika 3: Miscanthus lutariparius na jezeru Dongting (Kina) lijevo, transport biomase u tvornicu papira desno [4]..... | 19 | |
| Slika 4: Lagani beton na bazi biomase miskantusa [9]..... | 20 | |
| Slika 5: Purice na podlozi od miskantusa lijevo, zdrave noge purana na miskantusu desno [9]..... | 21 | |
| Slika 6: Miskantus u formi briketa [9] | Slika 7: Miskantus u formi peleta [9]..... | 22 |
| Slika 8: Miskantus u formi bale [9] | Slika 9: Miskantus u formi sječke [9]..... | 22 |
| Slika 10: Mehanizmi fitoremedijacije [16] | 27 | |
| Slika 11: Faze mikropropagacije [20]..... | 31 | |
| Slika 12: Uzgoj klica miskantusa na podlozi različitog sastava (a- MSR1, b- MSR2) [22] | 40 | |
| Slika 13: Rizogeneza Miscanthus x giganteus [22]..... | 41 | |
| Slika 14: Regeneracija biljaka iz kalusa miskantusa [23] | 43 | |
| Slika 15: Histološki razvoj somatskog embrija u kalusu iz mladog cvata genotipa M. sinensis 17 nakon 1 mjeseca kulture [24]..... | 47 | |
| Slika 16: Indukcija kalusa različitih genotipova miskantusa [24]..... | 48 | |
| Slika 17: Regeneracija biljaka različitih genotipova miskantusa na mediju 190-2 nadopunjen s 0.5 mg/L NAA i 0.5 mg/L KIN i prilagodba ex vitro uvjetima [24]..... | 51 | |

11. POPIS TABLICA

| | |
|--|----|
| Tablica 1: Osobine biljke miskantus [3] | 17 |
| Tablica 2: Sadašnja komercijalna proizvodnja miskantusa i primjena biomase [4]..... | 18 |
| Tablica 3: Utjecaj sastava podloge na razvoj meristemskih kultura <i>Miscanthus x giganteus</i> [22] | 39 |
| Tablica 4: Ukorjenjivanje <i>Miscanthus x giganteus</i> in vitro [22]..... | 42 |
| Tablica 5: Utjecaj dvaju različitih medija za regeneraciju (MR1-1 i MR2-2) na brzu regeneraciju iz kalusa starih 6 tjedana [23] | 45 |
| Tablica 6: Učinak medija i kombinacije regulatora rasta na stopu indukcije kalusa (CIR) odabranih genotipova i eksplantata miskantusa [24] | 49 |