

IN VITRO КУЛТУРА - АЛТЕРНАТИВНА МЕТОДА У ВЕГЕТАТИВНОМ РАЗМНОЖАВАЊУ МУНИКЕ (*Pinus heldreichii*) И МОЛИКЕ (*Pinus peuce*)

Љубинка Ђулафић, Снежана Будимир, Драгана Стојичић

Институт за ботанику и Ботаничка башта „Јевремовац“, Биолошки факултет, Таковска
43, Београд

Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Булевар деспота Стефана
142, Београд,

Институт за шумарство, Кнеза Вишеслава 3, Београд

Abstract

CULAFIC, Ljubinka, Snezana BUDIMI R, Dragana STOJICIC : IN VITRO CULTURE – AN ALTERNATIVE METHOD IN VEGETATIONAL REPRODUCTION OF (*Pinus heldreichii*) AND (*Pinus peuce*). Skup 2: 15-22. [Institute of Botany and Botanical Gardens „Jevremovac“, Faculty of Biology, Beograd; Institute for Biological Researches „Siniša Stanković“, Beograd; Institute of Forestry, Beograd].

In *Pinus heldreichii* Christ. and *Pinus peuce* Gris. zygotic embryo culture, organogenesis and somatic embryogenesis was achieved. The greatest number of adventitious buds was obtained after induction with benzilaminopurine (BA) at 2.2 or 4.4 μM , for 4 weeks. Further bud development was achieved on growth regulator-free medium supplemented with activated charcoal. After treatment with 1mM indole-3-butyric acid isolated shoots were rooted. The somatic embryogenesis was achieved in immature ovule culture. The embryogenic tissue formation was induced when the explants were first grown on medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2 mg/l) and BA (0.5 mg/l) and then transferred to medium with reduced auxin and cytokinin concentration. Embryogenic tissue consisted of embryos at early stages of development.

Key words: Adventitious bud, somatic embryogenesis, *Pinus heldreichii*, *Pinus peuce*, plant regeneration, clonal propagation.

Сажетак

У култури зиготских ембриона *Pinus heldreichii* Christ. и *Pinus peuce* Gris. постигнута је органогенеза и соматска ембриогенеза. Највећи број адвентивних пупољака добијен је после индукције са бензиламинопурином у концентрацији 2.2 или 4.4 μM , током 4 недеље. Издуживање пупољака постигнуто је на хранљивој подлози без регулатора растења, а у присуству активног угља. После третмана са индол-3-бутерном киселином, изоловани изданци су ожиљени. Соматска ембриогенеза добијена је у култури незрелих овула. Ембриогено ткиво је формирано када су експлантати гајени на хранљивој подлози са 2,4-дихлорофенокси сирћетном киселином (2 mg/l) и ВА (0.5 mg/l), а затим пренето на подлогу са смањеном концентрацијом ових регулатора растења. Ембриогено ткиво састојало се од соматских ембриона на раним ступњевима развића.

Кључне речи: Адвентивни пупољци, *Pinus heldreichii*, *Pinus peuce*, соматска ембриогенеза, регенерација биљака, клонална пропација.

УВОД

Четинари се размножавају семеном и класичним техникама вегетативне пропагације: калемљењем, резницама и положницама. Размножавање семеном је ефикасно, али је добијени биљни материјал веома хетероген. Регенерација биљака у условима *in vitro* се може користити као алтернативна или допунска метода класичним начинима вегетативног размножавања четинарских врста. Вегетативном пропагацијом добија се генетички идентичан биљни материјал. Међутим, због тешкоћа са оживљавањем, нарочито адултних биљака чији се генотип уствари жели умножити, стопа успеха ове методе је ограничена.

Почеци културе ткива четинарских врста датирају још из тридесетих година двадесетог века. Први експерименти односили су се на покушаје културе ембриона у стерилним условима. Педесетих година успостављене су културе калуса, а тек половином 60-тих појављују се радови који се односе на регенерацију биљака путем органогенезе. Последњих деценија посвећује се све већа пажња регенерацији четинарских врста, путем соматске ембриогенезе у условима *in vitro*.

Услови *in vitro* омогућавају мултипликацију биљака из појединачног семена одабраног генотипа, омогућавају селекцију и унапређење квалитета дрвенастих врста које се користе у индустријске сврхе, а такође и продукцију биљака које су прилагођене специфичним типовима земљишта или климатским условима. Услови *in vitro* олакшавају изучавање одређених стадијума развића током животног циклуса вишегодишњих биљака. Такође, омогућавају проучавање комплексне морфолошке и цитохистолошке грађе дрвенастих врста. Регенерација биљака *in vitro* може се постићи у култури аксиларних изданака, адвентивних пупољака или путем соматске ембриогенезе (Неšković i sar., 2003). За прве две методе неопходно је дефинисати услове за индукцију пупољака и оживљавање изданака, док су соматски ембриони биполарне структуре са формираним меристемом изданка и корена.

Комбинацијом класичних и алтернативних техника могу се остварити значајни резултати у програмима унапређења шумарске привреде.

Муника *Pinus heldreichii* Christ. и молика *Pinus peuce* Gris. спадају међу најзначајније врсте дендрофлоре Балканског полуострва. Ове врсте су терцијарни реликти и субендемита Балканског полуострва (Vidaković, 1982). Прилагођене су кратком вегетационом периоду високопланинске зоне, сушном и топлим планинском лету са веома интензивном сунчевом радијацијом, али и суровим зимама (Јanković, 1969). Ове врсте су изразито отпорне према неповољним климатским условима и условима станишта.

Данас је високопланинска вегетацијска зона мунике и молике деградирана (Јanković, 1991). Увођењем ових врста у културу *in vitro* отвориле би се могућности за њихову пропагацију савременим техникама. Ово је посебно значајно јер обе врсте имају ограничену способност за природно подмлађивање. Због својих еколошких карактеристика муника би била погодна за пошумљавање сиромашних, ксеротермних и мезофилних терена. Молика се може користити за пошумљавање бујичних подручја и терена склоних ерозији. Декоративност молике је утицала да се ова врста све више користи као парковско дрво, посебно у западној Европи.

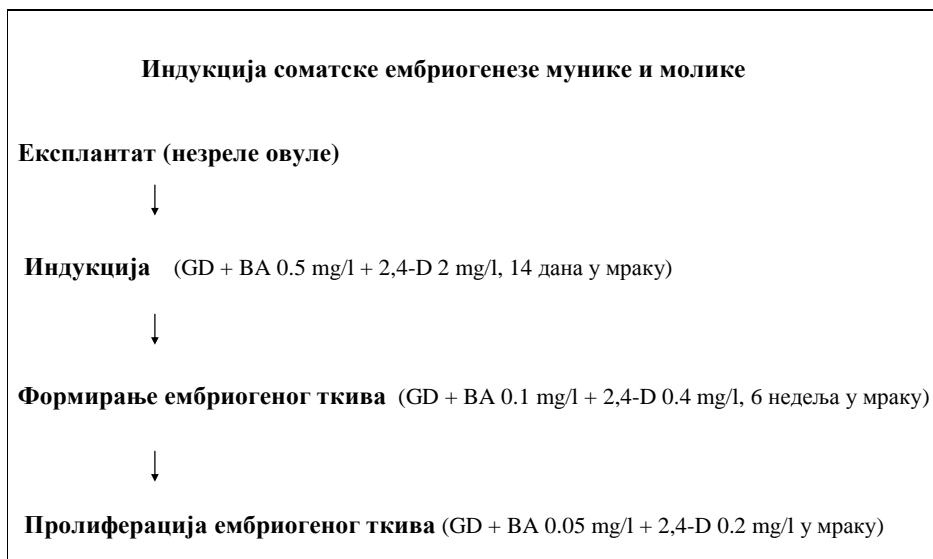
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИКА

Биљни материјал који је коришћен током експерименталног рада била су семена мунике *Pinus heldreichii* Christ. и молике *Pinus peuce* Gris. Семена су изолована из

шишарица различите старости, које су прикупљене са већег броја стабала са слободним опрашивањем. Шишарице мунике пореклом су из природне популације са планине Ловћен, а шишарице молике из вештачки подигнуте културе у Катићима изнад Ивањице (планина Мучањ). Семена из зрелих шишарица су изолована и чувана у фрижидеру на температури од 4 °C до дана коришћења. Семена из незрелих шишарица нису изолована одмах по прикупљању, већ су целе шишарице чуване у фрижидеру до коришћења, а највише до 30 дана.

Хранљива подлога која је коришћена у овим експериментима је GD (Gresshof & Doу, 1972). Ради индукције адвентивних пупољака, хранљивим подлогама је додаван цитокинин ВА (бензиламинопурин) у следећим концентрацијама 2.2, 4.4, 11.1 и 22.2 μM . Индукција је трајала 4 недеље. Експлантати су затим пренети на хранљиву подлогу истог основног састава, али без регулатора растења. Подлога је садржавала активни угаљ у концентрацији 5 gr/l. Културе су преношене сваке четири недеље на свежу хранљиву подлогу. Ради ожиљавања, издужени адвентивни пупољци су излагани краткотрајном дејству воденог раствора ауксина - ИВА (индол-3-бутерна киселина) у концентрацији 1 mM. Културе ембриона са адвентивним пупољцима су гајене на температури 25 ± 2 °C под белом флуоресцентном светлошћу, при фото-периоду од 8 сати светла и 16 сати мрака.

У циљу индукције соматске ембриогенезе, изоловане овуле мунике и молике су постављене на GD хранљиву подлогу, у којој је концентрација азота била смањена на половину. Хранљивој подлози додавани су и регулатори растења: 2,4-D (дихлорфенокси сирћетна киселина) 2 mg/l и ВА 0.5 mg/l. Индукција је трајала 14 дана. За пролиферацију ембрионог ткива експлантати су пренети на хранљиву подлогу, са истим регулаторима растења, чија је концентрација смањена на петину.



РЕЗУЛТАТИ

Регенерација мунике путем индукције адвентивних пупољака

Резултати су показали да је цитокинин, ВА, примењен у концентрацији од 2.2 и 4.4 μM (Таб.1), у трајању од четири недеље, најефикаснији за индукцију адвентивних

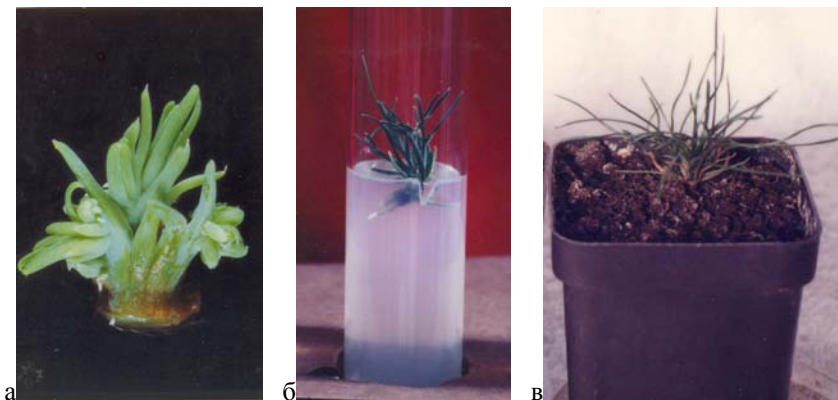
пупољака (слика 1а). Када индукција траје краће долази до формирања мањег броја пупољака, али се ти пупољци брже издужују (Stojičić et al., 1999). Издуживање пупољака стимулисано је у присуству активног угља, што је битно за фазу оживљавања. За оживљавање из културе, изоловани су пупољци дужи од 5 mm. Континуирано гајење изданака (4 недеље) на подлози са нижим концентрацијама (0.2 и 0.05 mg/l) овог хормона, довело је до формирања калуса на базалном делу изданка, али не и до формирања корена. Краткорочно третирање ових пупољака, 1mM индол-3бутерном киселином (ИВА), довело је до њиховог оживљавања (слика 1б). Оживљене биљке које су имале карактеристичан фенотип, пренете су у нестерилне услове стакленика, у подлогу са супстратом (мешавина земље, ђубрива и кварцног песка). Хистолошка истраживања су показала да се адвентивни пупољци формирају директно на котиледонима, од епидермалних и субепидермалних ћелија, а индиректно на хипокотилу, од ћелија формираног калусног ткива (Budinir et al., 2002).

Табела 1. Утицај ВА на индукцију адвентивних пупољака мунике

ВА (μM)	Просечан број пупољака по експлантату	Број пупољака ≥ 5 mm
2.22	10.58 ± 0.67	69
4.40	15.59 ± 0.69	75
11.10	9.00 ± 0.68	15
22.20	5.61 ± 0.79	5
Σ	10.19 ± 0.39	164

Регенерација молике путем индукције адвентивних пупољака

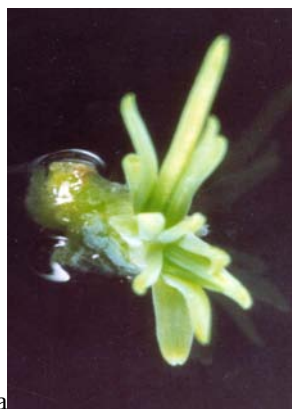
Индукција адвентивних пупољака била је најуспешнија када су ембриони молике гајени на хранљивој подлози GD, са цитокинином ВА, у концентрацији од 2.2 μM (Таб.2). Након четворонедељног индуктивног третмана, експлантати су пренети на подлогу без регулатора растења, са активним угљем, ради издуживања пупољака (слика 2а). Пупољци који су достигли дужину од 5 mm изоловани су са матичног експлантата и краткотрајно третирани са 1mM ИВА, што је довело до формирања корена. Биљке (слика 2б) су пренете у нестерилне услове стакленика, у подлогу са супстратом (мешавина земље, ђубрива и кварцног песка).



Слика 1. Регенерација мунике у култури *in vitro*; а) адвентивни пупољци; б) изоловани изданак; в) аклиматизована биљка

Табела 2. Утицај ВА на индукцију адвентивних пупољака молике

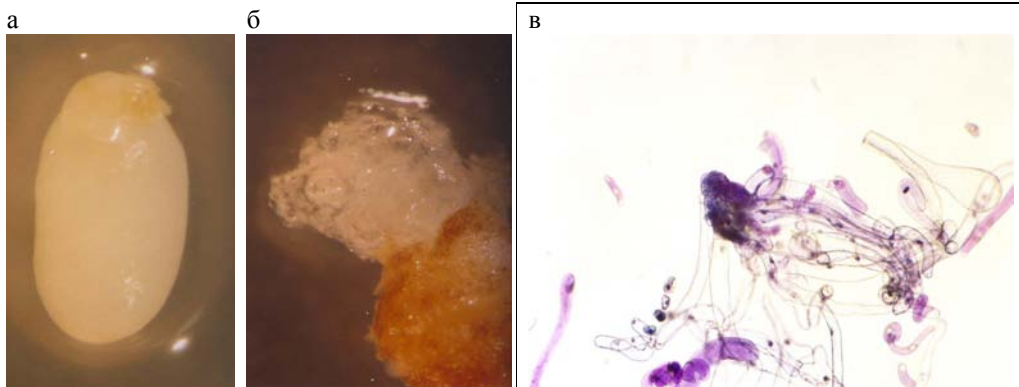
ВА (μM)	Просечан број пупољака по експлантату	Просечна дужина пупољака (mm)
2.22	15.12 ± 0.99	3.77 ± 0.69
4.40	12.95 ± 1.03	3.03 ± 0.78
11.10	10.40 ± 0.95	2.75 ± 0.80
22.20	10.10 ± 0.91	2.32 ± 0.80
Σ	12.14 ± 0.49	2.97 ± 0.38



Слика 2. Регенерација молике у култури *in vitro*; а) адвентивни пупољак; б) аклиматизована биљка

Индукција соматске ембриогенезе у култури мунике и молике

За индукцију соматске ембриогенезе коришћене су оплођене овуле са незрелим зиготским ембрионима мунике и молике (слика 3а). Овуле које су гајене 14 дана на индуктивној подлози са ауксином 2.4-D (2 mg/l) и цитокинином ВА (0.5 mg/l), су током времена повећавале волумен, али се на њима није учавало ембриогено ткиво. Након овог индуктивног третмана, тек када су овуле пренете на подлогу са смањеном концентрацијом регулатора растења, дошло је до формирања калуса. Уочена су два типа калуса, један на површини овуле, а други на микропиларном полу (слика 3б). Микроскопском анализом калусног ткива утврђено је да је калус формиран на површини овуле растресит, грађен од издужених и вакуолизованих ћелија. Овај калус, пореклом од ћелија ендосперма, није био ембриоген. Калус, формиран на микропили, био је ембриоген. Овај калус је растресит, муцилаген и грађен од соматских ембриона на раним ступњевима развића (слика 3в). Ембриони су биполарне структуре са меристемским ћелијама на дисталном, и дугачким вакуолизованим ћелијама суспензора на проксималном крају.



Слика 3. Индукција соматске ембриогенезе; а) оплођена незрела овула; б) ембриогено ткиво на микропиларном полу овуле; в) соматски ембрион

ДИСКУСИЈА

Могућност регенерације биљака путем органогенезе или соматске ембриогенезе испитивана је код различитих четинарских врста. Протокол који би важио за све врсте рода *Pinus*, није установљен. За сваку врсту, неопходно је дефинисати услове под којима је регенерација биљака у култури *in vitro* могућа. Успешност методе зависи од врсте ткива или органа који се користи као примарни експлантат за културу *in vitro*. Регенерација четинара постигнута је само у култури ембрионалних и јувенилних ткива. Експлантати, узети са адултних стабала, имају мањи потенцијал за органогенезу, а соматска ембриогенеза, код оваквих експлантата, описана је само у култури *Pinus patula* (Malabadi & van Staden). Органогенеза и соматска ембриогенеза су најчешће постигнуте на хранљивим подлогама MS (Murashige & Skoog, 1962) и LP (von Arnold & Eriksson, 1981). Пресудну улогу имају екзогени регулатори растења типа цитокинина и ауксина, који у интеракцији са ендогеним фитохормонима датог експлантата условљавају правце морфогенезе *de novo*. У култури мунике и молике, коришћење цитокинина ВА, било је неопходно за индукцију адвентивних пупољака. Ниже концентрације ВА (2.22 и 4.4 μM) биле су ефикасније и у стимулацији формирања пупољака, али и њиховог издуживања. За индукцију соматске ембриогенезе, осим цитокинина, ВА, било је неопходно присуство ауксина 2.4-D. Слични резултати добијени су и у култури осталих четинарских врста. У култури *Abies nordmanniana* (Norgaard & Krogstrup, 1991) и *Picea omorika* (Budimir & Vujičić, 1992) индукција соматске ембриогенезе постигнута је у одсуству ауксина. За умножавање ембриогеног ткива, и у култури мунике и молике, као и у култури већине описаних четинарских врста (Atree, et al., 1991, 1993), било је неопходно смањити концентрацију коришћених регулатора растења. Пролиферација ткива, осим од услова културе, зависи и од генотипа. У култури *Pinus strobus* забележена је стопа индукције ембриогеног ткива од 6% (Kaul, 1995) до 54% (Finer et al., 1989). Неке ембриогене линије задржавају пролиферативност неколико месеци, а понеке и неколико година. Ембриогено ткиво *Gymnospermae* је специфично по томе што се састоји од великог броја ембриона. Сазревање соматских ембриона је критична фаза за регенерацију биљака. Последњих година, постигнут је значајан успех у дефинисању услова при

koјима долази до сазревања ембриона (Stassola et. al. 2002). За сазревање ембриона, важно је присуство абсцисинске киселине, али процес умногоме може бити регулисан и подешавањем осмотског потенцијала подлоге. Успешност регенерације биљака, и путем органогенезе и путем соматске ембриогенезе, зависи и од услова гајења култура (светлост, температура и дужина фотопериода).

При решавању проблема заштите и очувања ендемореликтних врста мунике *Pinus heldreichii* и молике *Pinus peuce*, значајна помоћ може бити метода културе *in vitro*. Такође, метода *in vitro* може бити од помоћи у подизању квалитета и квантитета производње ових врста у шумарству.

Овај рад, финансиран је од стране Министарства науке и заштите животне средине Републике Србије, кроз пројекат бр. 143026.

ЛИТЕРАТУРА

1. A tree, S. M., L. C. Fowke : Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers. Biotechnology in agriculture and forestry. High-tech and micropropagation I (ed. By Y. P. S. Bajaj). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 17: 53-70. 1991.
2. A tree, S. M., L. C. Fowke : Embryogeny of gymnosperms: advances in syntetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 35: 1-35. 1993.
3. Budimir, S., R. Vujičić : Benziladenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omorika* (Pančić) Purk. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 31(2): 89-94. 1992.
4. Budimir, S., A. Subotić, D. Stojičić : Adventitious bud induction in *Pinus heldreichii* Christ. seedling explant culture. *Ekologija, Vol. 37, No, 1-2, 45-52.* 2002.
5. Finer, J., H. B. Kriebel, M. R. Bescwar : Initiation of embriogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Rep.* 8: 203-206. 1989.
6. Greshoff, P.M., C. H. Doy : Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107: 161-170. 1972.
7. Janković, M.: Neki problemi ekologije, cenologije i rasprostranjenja endemo-reликтне balkanske врсте *Pinus peuce*. *Zbornik na Simpoziumot na molikata, Skopje.* pp. 173-178. 1969.
8. Janković, M.: On the urgent need to plant a constant belt of the endemorelict Balkan pines *Pinus heldreichii* and *Pinus peuce* in the mountains of Serbia and Yugoslavia. *Ecology* 26: 61-67. 1991.
9. Kaul, K.: Somatic embryogenesis in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol. 3, 257-268. S. Jain, P. Gupta, R. Newton (Ed). Kluwer Academic Publishers. 1995.
10. Malabadi, R. B., J. van Staden : Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. *Tree Physiology.* 25 (1): 11-16. 2005.
11. Murashige, T., F. Skoog : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phisiol. Plant.* 15: 473-497. 1962.
12. Nešković, M., R. Konjević, Lj. Ćulafić : **Fiziologija biljaka.** Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. NNK-International, Beograd. 2003.
13. Norgaard, J. V., P. Krogstrup: Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana*. *Lk. Plant Cell Rep.* 9: 509-513. 1991.
14. Stassola, C., L. Kong, E. C. Yeung, T. A. Thorpe : Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 93-105. 2002.
15. Stojičić, D., S. Budimir, Lj. Ćulafić: Micropropagation of *Pinus heldreichii*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 59: 147-150. 1999.
16. Vidaković M.: **Ćetinjaće-morfologija i varijabilnost.** Jugoslavenska Akademija Znanosti i Umjetnosti, Zagreb, str.428-435. 1982.

17. von Arnold, S., T. Eriksson: *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.* 59: 870-874. 1981.

Примљено: 13.12.2005

Одобрено: 5.10.2006.