

**MIKROPROPAGACIJA I SOMATSKA EMBRIOGENEZA  
BAGREMA (*ROBINIA PSEUDOACACIA* L.)  
Micropropagation and somatic embryogenesis of black locust  
(*Robinia pseudoacacia* L.)**

F. Pustahija<sup>1</sup>, S. Međedović<sup>2</sup> i A. Čaušević<sup>1</sup>

1. Faculty of Science, University of Sarajevo,

2. Faculty of Forestry, University of Sarajevo;

**Abstract**

Initial explants, axillary and apically buds meristems, of *Robinia pseudoacacia* L. were excised from five-year old trees and cultured on basal MS medium containing 0,5 mg/l BA, 20 mg/l adenine sulfate and 0,02 mg/l NAA. Multiplication of nodal segments were tested on the same medium and concentration of the growth regulators. For rhisogenesis 0,5 mg/l IBA was added to the MS basal medium. The root system was regenerated in 100%. Acclimatization of complete plants were efficient. Somatic embryogenesis of black locust was obtained from non-embryogenic explants. Callus cells suspension were cultured on liquid MS basal medium containing 8 mg/l 2,4D and 0,5 mg/l BA in the first phase of experiment and then on liquid MS basal medium containing 0,3 mg/l 2,4D and 1 mg/l BA. Embryogenic structures differentiated in this phase were transferred on MS medium lacking hormones.

Key words: *Robinia pseudoacacia*, black locust, MS, plant multiplication, somatic embryogenesis.

Abbreviations: BA - 6-benzylaminopurine,  
NAA - 1-naphthalene acetic acid,  
IBA - Indolyl buteric acid,  
2,4D - 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

**1. Uvod**

Obični bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.) prenešen je iz Sjeverne Amerike u Evropu 1601. godine. Mada ne pripada komercijalnim lišćarima brzo se proširio u ekosisteme lišćarsko-listopadnih šuma. Posebno je cijenjen kao pionirska vrsta u

učvršćivanju klizišta i pjeskovitih terena, ali i kao azotofiksator i medonosna vrsta.

Introgresivnom hibridizacijom dobijeni su od osnovne vrste brojni kultivari sa kuglastom krošnjom, različitom formom stabla, visinom, bojom cvijeta i drugim dekorativnim svojstvima. Željene novostečene somatske mutacije moguće je reprodukovati na nove generacije jedino vegetativnom propagacijom, a jedan od takvih metoda, sa visokim stepenom multiplikacije klonski selekcioniranih oblika, je kultura *in vitro*.

Mikropropagacijom bagrema prvi se bavio Chalupa (1981, 1983). U cilju obezbjeđenja masovne propagacije Chalupa (1987) je pokušao razviti postupak somatske embriogeneze. Nakon Chalupe mikropropagacijom bagrema bavili su se Kolevska-Pletikapić i Tomović (1988) i Kolevska-Pletikapić, Tomović i Jelenčić (1987) u bivšoj Jugoslaviji. Međutim, zbog problema rejuvenilizacije i drugih poteškoća sa kulturom *in vitro* drvenastih vrsta biljaka, nauka još nije ovladala ovom tehnologijom masovne proizvodnje sadnica bagrema.

Cilj ovog rada bio je pojednostavljenje postupaka kulture *in vitro* i metoda dobijanja embriogenog kalusa iz neembriogenih segmenata. Pored dosadašnjih iskustava autorâ koji su radili na kulturi *in vitro* bagrema, korištena su i iskustva sa drugim drvenastim vrstama stečena u Institutu za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Sarajevo. Rezultati ovih istraživanja rasvjetljavaju neke bitne nepoznanice u razvoju tehnologije masovne multiplikacije sadnica bagrema postupcima adventivnog pupanja i somatskom embriogenezom.

## 2. Materijal i metod rada

Materijal za rad na kulturi *in vitro* bagrema potiče iz zasada sa područja Odžaka. Od petogodišnjih stabala uzeti su segmenti dužine 2-3 cm s nodijima jednogodišnjih pupova. Uzorci su prethodno oprani u mikrobiološkom sapunu, potom sterilisani 70% etanolom u trajanju od 30 sekundi. Nakon toga uzorci su prenešeni u smjesu varikine i destilovane vode (1:4), a zatim su više puta ispirani sterilnom destilovanom vodom.

Kao početni eksplantati korišteni su aksilarni i apikalni pupovi, smješteni ispod kore u pazušcima listova. Izolirani meristemi su inokulirani na podlogu 1 (Tabela 1.) i kultivirani u klima komori pri uslovima 25-26°C, sa fotoperiodom 16 sati svjetla i 8 sati mraka.

Za multiplikaciju su korišteni nodalni segmenti veličine 0,5-3 cm, koji su svake 3-4 sedmice prebacivani na svježiji medij i održavani u klima komori.

### 2.1 Medij za indukciju, regeneraciju i multiplikaciju

Kao osnovna podloga za indukciju, regeneraciju i multiplikaciju korištena je podloga 1, sa pH podešenim na 5,5-5,6. Sterilizacija podloge vršena je autoklaviranjem na 121°C u trajanju 20 minuta.

## 2.11 Medij za indukciju kalusa

Za indukciju kalusa korištena je osnovna podloga 2 (Tabela 1.), čija je pH vrijednost, prije autoklaviranja ( $121^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 20 minuta), kao i u prethodnom slučaju podešena na 5,5-5,6. Podloga 2, sa izuzećem učvršćivača agara, korištena je za uzgoj pojedinačnih ćelija kalusa, koje su u kasnijim fazama prenošene na nove podloge za dobivanje bipolarnih tijela u somatskoj embriogenezi.

Tabela 1. Sastav podloge za indukciju, regeneraciju, multiplikaciju, somatsku embriogenezu i zakorjenjivanje

Table 1. Media contents for induction, regeneration, multiplication, somatic embryogenesis and rooting

Contents	Medium					
	1	2	3	4	5	6
	Concentration (mg/l)					
<b>Macroelements</b>						
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	400	400	400	400	400	400
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	556	556	556	556	556	556
$\text{K}_2\text{SO}_4$	990	990	990	990	990	990
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96	96	96	96	96	96
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	360	360	360	360	360	360
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	170	170	170	170	170
Iron						
NaFeEDTA	30	30	30	30	30	30
<b>Microelements</b>						
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
KJ	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
<b>Vitamins</b>						
Thyamin-HCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Nicotinic acid	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Pyridoxine-HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Aminoacids</b>						
Lysine	100	/	/	/	/	/
<b>Carbohydrats</b>						
Myoinositol	100	100	100	100	100	100
Sucrose	30000	30000	30000	30000	30000	30000
<b>Growth regulators</b>						
BA	0,5	/	0,5	1	/	/
NAA	0,02	/	/	/	/	/
IBA	/	/	/	/	/	0,5
Adenine sulphate	20	/	/	/	/	/
2,4 D	/	1	8	0,3	/	/
<b>Media sticker</b>						
Agar	9000	9000	/	/	9000	9000

## 2.12 Medij za indukciju somatske embriogeneze

Osnovne podloge za indukciju somatske embriogeneze su podloge 3 i 4 (Tabela 1). U ovoj fazi kulture su održavane u šejkeru sa 120 obrtaja u minuti, pri temperaturi 25°C. Visoka početna koncentracija auksina 2,4 D u podlozi 3, koja je iznosila 8 mg/l, smanjena je kasnije u podlozi 4, na 0,3 mg/l, a zatim, nakon formiranja embriogenih struktura kalusa, su prebacene na čvrstu podlogu 5 (bez hormona), gdje je završen njihov razvoj u klima komori. Potpuno regenerirane biljke su presađivane u prethodno sterilisani humus i smjesu humusa, pijeska, perlita i kvarcnog pijeska (u omjeru 5:3:1:1).

## 3. Rezultati istraživanja

Na osnovnu podlogu (podloga 1) zasađeni su početni eksplantati. Nakon 8-10 dana uočena je proliferacija meristema, a začetak organa (organogeneza) uočen je nakon 18-20 dana.

Paralelno sa proliferacijom i pojavom organogeneze odvijala se masovna produkcija kalusa. Pojava kalusa nije kočila regeneraciju i proces multiplikacije. U početnim fazama kalus je imao svijetlo žutu boju da bi na kraju prve rekulture imao tamno žutu do svijetlo smeđu boju (Slika 1).

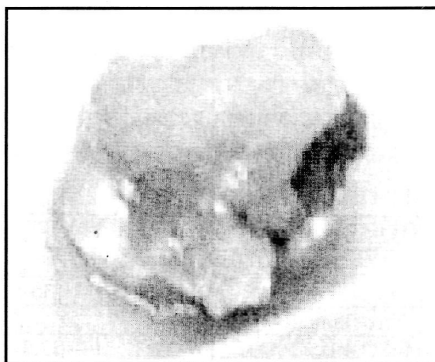


Photo1: Callus formation

Pri svakoj novoj rekultivaciji adventivni izdanci su odvajani od osnovnog kalusa. U daljem toku rekultivacije, na smeđem kalusu su se pojavljivale svijetlije zone, koje su nakon određenog vremena (1-3 sedmice) ozelenile i proliferirale u nove izdanke (Slike 2 i 3).

Proces multiplikacije provoden je, nakon 3-4 sedmice, subkultiviranjem izdanaka. Podloga 1 se pokazala vrlo uspješnom, kako za indukciju tako i za multiplikaciju. Stopa multiplikacije je bila veoma visoka. U početnoj kulturi ona je iznosila 4-8 izdanaka (Slika 4), dok je u kasnijim fazama rekultiviranja ujednačena na 8-14 izdanaka po eksplantatu. Vrlo jaku izdanačku moć bagrema dokazuje brzorastući razvoj izdanaka, koje nije bilo potrebno elongirati u tami. Nadzemni izdanci su za 5-7 dana dostizali visinu 4-5 cm (Slika 5).



Photo 2: Bud initiation

Zakorjenjivanje nadzemnih izdanaka provodeno je na podlozi 6 (Tabela 1).

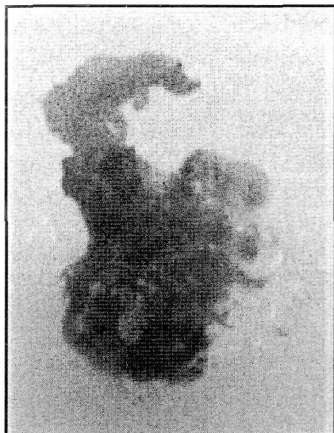


Photo 3: Proliferation of shoots

Frekvencija ožiljavanja izdanaka veličine 5-6 cm je bila 100%. Kod ovih izdanaka prije ožiljavanja nije dolazilo do pojave kalusa na bazi izdanka. Korijenov sistem razvijao se sa 1-2 žile srčanice, na kojima su se pojavljivali korjenovi drugog i trećeg reda. Primjećeno je da kod kraćih izdanaka, dužine do 2 cm, nije ostvarena rizogeneza.

Nakon ostvarivanja rozogeneze kompletne biljke su prebačene u smjesu humusa, pijeska, perlita i kvarcnog pijeska (omjer 5:3:1:1), gdje je vršena njihova aklimatizacija (Sl. 6).

Dobijeni rezultati indukcije, regeneracije, multiplikacije i rizogeneze čine osnovni preduslov za razvoj tehnologije masovne mikropropagacije bagrema.

### 3.1 Somatska embriogeneza

Somatska embriogeneza je osnov za razvoj metoda dobijanja embrionalnih stadija, koji bez fuzije gameta mogu dati kompletne biljke. Ovaj postupak do sada je poznat kod vrlo malog broja drvenastih vrsta. Dobijanje embriogenih stanica iz neembriogenog eksplantata predstavlja savršenstvo tehnološkog postupka masovne multiplikacije, gdje svaka ćelija daje somatski embrij (bipolarnu strukturu) koji se razvija u kompletnu biljnu individuu. Somatski embriji strukturno i biohemijski su istovjetni zigotskim embrijima, a njihovo dobijanje leži u osnovi pritaženih totipotentnih osobina biljne ćelije.



Photo 5: Elongation of shoots



Photo 4: Multiplication of shoots

Paralelno sa provođenjem postupka adventivnog pupanja, na podlozi 2 (bez agara) uzgajane su pojedinačne

ćelije kalusa za potrebe somatske embriogeneze. Somatsku embriogenezu bagrema na embriogenom tkivu nezrelog sjemena ostvario je Chalupa (1990.), dok je u našim ogledima vršen pokušaj dobijanja somatske embriogeneze od neembriogenog tkiva. Neembriogeni kalus u aparaturi šejkera (tresilice) je razbijen na pojedinačne ćelije i njihove nakupine. Ćelije su uzgajane na podlozi 2. U daljem toku eksperimenta pojedinačne ćelije su prenešene na podlogu 3,



Photo 6: Plant acclimatisation

gdje su uzgajane 12 sedmica, a zatim na podlogu 4, na kojoj je, u toku naredne 1-2 sedmice, uočena somatska embriogeneza. U toku eksperimenta primjećeno je da pojedinačne ćelije izduživanjem daju proembrio (Slike 7 i 8) i somatske embrije (Slike 9, 10 i 11), koji će se, u daljem toku eksperimenta, razviti u kompletnu individuu.

Razradom tehnološkog postupka somatske embriogeneze riješen je problem masovne multiplikacije sadnog materijala. Izuzetan uspjeh eksperimenta je dobivanje embriogenih struktura iz neembriogenog eksplantata bagrema.

#### 4. Diskusija

Za razliku od dosadašnjih rezultata mikropropagacije bagrema koje su proveli Chalupa (3), Kolevska-Pletikapić i Tomović (8.), te Kolevska-Pletikapić i suradnici (9), u ovim eksperimentima korištena je kao osnovna MS podloga, uz dodatak 0,5 mg/l BA, 0,02 mg/l NAA i 20 mg/l adenin sulfata. Na ovoj podlozi je ostvarena visoka stopa multiplikacije (8-14 izdanaka po eksplantatu), a što bi se moglo objasniti i dugotrajnim održavanjem u kulturi (7).

Velika količina kalusa, koja je uočena u eksperimentu, iako je nepoželjna pojava, nije smanjivala stopu multiplikacije. Sličnu pojavu su uočili Kolevska-Pletikapić i Tomović (8), što su pokušali eliminisati smanjenjem koncentracije NAA, ali bez očekivanog rezultata. Međutim, uočeno je i da visoka koncentracija citokinina može dovesti do preobilnog stvaranja kalusa (7), ali smanjenje njegove koncentracije u eksperimentu nije vršeno.

U procesu ožiljavanja, podloga 6 se pokazala kao veoma prikladna. Nakon provedenog postupka ožiljavanja izdanaka, sadnice su aklimatizirane na uslove spoljašnje sredine. Aklimatizaciju smo provodili prenošenjem sadnica u sterilni humus. Zbog visokog sadržaja vlage i slabog aerisanja podloge sadnice se nisu razvijale. U

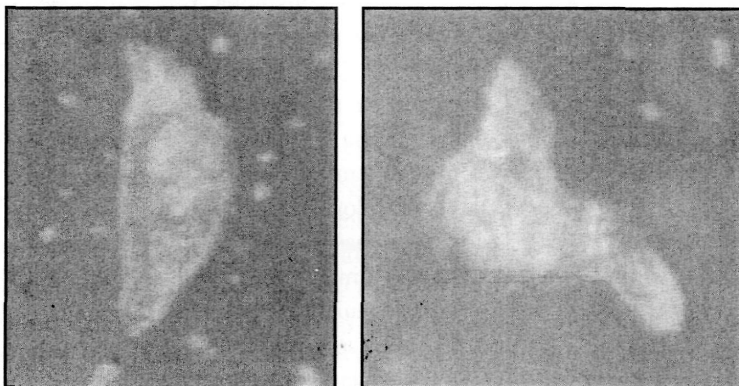


Photo 7: Early embryos



drugoj seriji sadnice su prebačene u smjesu humusa, pijeska, perlita i kvarcnog pijeska. Ovako pripremljena podloga je obezbjeđivala daleko bolji rast i razvoj mladih sadnica bagrema u uslovima aklimatizacije.

Somatsku embriogenezu bagrema ostvario je Chalupa (4). On je, u svojim eksperimentima, koristio nezrelo sjeme, koje je kultivisao na MS mediju uz dodatak različitih koncentracija regulatora rasta. Velika koncentracija auksina na početku eksperimenta i njeno kasnije smanjivanje ili potpuno izostavljanje iz medija se pokazalo kao veoma uspješno. Međutim, izostavljanje auksina iz podloge nije uvijek neophodno. Chalupa (5) kod *Tilia cordata* Mill. i Bonneau et al (1990.) kod *Euonymus europaeus* L. su kultivisali eksplantate nekoliko sedmica na mediju sa niskom koncentracijom 2,4D ili slabim auksinom kao što je IAA.



Photo 9, 10 i 11: Different stages of somatic embryos

Somatska embriogeneza kod bagrema dobijena je na neembrijskim eksplantatima, koji su kultivisani na osnovnoj MS podlozi, uz dodatak različitih koncentracija regulatora rasta. I ovdje se uspješnim pokazalo kultivisanje eksplantata, prvo pri velikoj koncentraciji 2,4D i njeno kasnije izostavljanje iz podloge. Slične podatke kod *Populus* spp. dobili su Michler i Bauer (1991.) na tkivu lista i MS podlozi sa visokom koncentracijom 2,4D. Izgleda da je priroda regulatora rasta koji se koriste u mediju za indukciju osnovni faktor pojave somatske embriogeneze. Tip auksina, kao i njegova koncentracija mogu povećati frekvenciju stvaranja somatskih embrija. Drugi značajan činioc mogao bi biti razvojni stadij početnog eksplantata na što upućuju radovi Tulecke i McGranahan (1985.), Sotak et al. (1991.) i De March et al. (1993).

## 5. Zaključak

- (a) Početni eksplantati (apikalni i aksilarni pupovi) uvođeni su na podlogu 1 gdje je ostvarena regeneracija izdanaka;
- (b) Na podlozi 1 je ostvarena visoka multiplikacija (8-14 izdanaka po eksplantatu);
- (c) Proces zakorjenjivanja izdanaka dužih od 2 cm na podlozi 6 bio je u potpunosti (100%) uspješan;
- (d) Aklimatizacija ožiljenih biljaka odvijala se na podlozi od humusa, pijeska, perlita i kvarcnog pijeska (5:3:1:1).

Osnovna MS podloga uz dodatak 0,5 mg/l BA, 0,02 mg/l NAA i 20 mg/l adenin sulfata bila je uspješna za kulturu *in vitro* bagrema. Rezultati oglada upućuju na zaključak da bi pri uslovima primijenjenih tehnika kulture *in vitro* moguće bilo razviti i tehnološki postupak masovne multiplikacije sadnica bagrema.

Somatska embriogeneza bagrema ostvarena na MS mediju uz dodatak 8 mg/l 2,4D i 0,5 mg/l BA na početku uspostavljanja kulture, i 0,3 mg/l 2,4D i 1 mg/l BA u kasnijim fazama održavanja kulture (sve do pojave embriogenih struktura, nakon čega je kultiviranje nastavljeno na mediju bez hormona) bila je veoma uspješna. Ako je početni eksplantat adekvatno odabran, kao i kombinacija i koncentracija regulatora rasta, može se podstaknuti stvaranje somatskih embrija iz kojih će se razviti kompletne biljne individue.

### Zahvale

Zahvaljujemo Institutu za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Sarajevo, gdje je eksperiment urađen; Centru za ihtiologiju i ribarstvo, Sarajevo, za pomoć pri radu; te Katedri za zaštitu šuma Šumarskog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, na ustupljenoj fotoopremi.

Posebnu zahvalnost dugujemo prof. dr. Rifatu Hadžiselimoviću na razumijevanju, podršci i savjetima.

### Literatura:

1. Bonneau L., Beranger-Novat N., Martin-Tanguy J. and Monin J. (1990): Polyamines and somatic embryogenesis in spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). The effects of difluoromethylarginine and difluoromethylornithine, Flores HE, Arteca RN & Shannon JC (Eds): Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interactions: American Society of Plant Physiologists, Pennsylvania State University Press, University Park, 363-367.
2. Chalupa V. (1981): Clonal propagation of broad-leaved forest trees *in vitro* *Comun. Inst. Forest. cechosl.*, 12, 255-271.
3. Chalupa V. (1983): *In vitro* Propagation of Willows (*Salix* spp.), European Mountain-ash (*Sorbus aucuparia* L.) and Balck locust (*Robinia pseudoacacia* L.) *Biologia Plantarum*, 25 (4) : 305 - 307.
4. Chalupa V. (1987): Somatic emryogenesis and plant regeneration in *Picea*, *Quercus*, *Betula*, *Tilia*, *Robinia*, *Fagus*, and *Aesculus*. *Communicationes Instituti Forestalis, Cechoslovaniae*, 15, 133-148.
5. Chalupa V. (1990): Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Plant Cell Rep.* 9 : 398-401.
6. De March G., Grenier E., M. Nicole, Sulmont G., David H. and David A. (1993): Potential of somatic embryogenesis in *Prunus avium* L. immature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34 : 209-215.
7. Jelaska S. (1994) : Kultura biljnih stanica i tkiva, školska knjiga, Zagreb.



8. Kolevska-Pletikapić B. i Tomović Z. (1988): Mikropropagacija bagrema, Šumarstvo 5-6, 29-35.
9. Kolevska-Pletikapić B., Tomović Z., i Jelenčić B. (1987): Morfogeneza bagrema u kulturi tkiva. VIII Simpozij Jugoslovenskog društva za fiziologiju biljaka, Tuheljske Toplice, Knjiga sažetaka, 91.
10. Michler, C.H., Bauer E.O. (1991): High frequency somatic embryogenesis from leaf tissue of *Populus* ssp. Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, Plant Science 77, 111-118.
11. Sotak R.J., Somemer H.E. and Merkle S.A. (1991): Relation of the developmental stage of zygotic embryos of yellow-poplar to their somatic embryogenetic potential. Plant Cell Rep. 10 : 175-178.
12. Tulecke W., McGranahan G. (1985): Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon tissue of walnut, *Juglans regia* L. Plant Sci., 40 : 53-67.

### Summary

Initial explants (axillary and apically buds meristems) of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) were cultured in agar MS medium supplemented with BA (0,5 mg/l), adenin sulfate (20 mg/l) and NAA (0,02 mg/l). Response of initial explants in this medium was good. High rate of multiplication of nodal segments was obtained in the same medium. The root system was regenerated in 100% in agar MS medium supplemented with 0,5 mg/l IBA. Rooted plants were transferred, after period of acclimatisation, to mixture of humus, sand, perlite and quartz sand (5:3:1:1).

Results of the experiment show that is possible to obtain technological procedure for mass multiplication of black locust by tissue culture technics.

Somatic embryogenesis of black locust were obtained from non-embryogenic explants. Somatic embryos were differentiated indirectly from embryogenic cell suspension callus initiated from shoots. Callus cell suspension were cultured on the liquid MS basal medium supplemented with 8 mg/l 2,4D plus 0,5 mg/l BA at the beginning of the experiment, and 0,3 mg/l 2,4 D plus 1 mg/l BA in the later phases. Developing embryogenic structure in this medium were transferred on media lacking hormones. Removal of 2,4D from the culture medium seems to be very efficient. If initial explants are properly selected as well as combination and concentration of growth regulators somatic embryogenesis can be quickly obtained.