

**BOLESTI I ŠTETOČINE KOJE UGROŽAVAJU
ŠUMSKE EKOSISTEME U BOSNI I HERCEGOVINI**
**Diseases and pests threatening forest ecosystems
in Bosnia-Herzegovina**

Usčuplić Midhat i Dautbašić Mirza

Abstract

Damage to forests that has been done during the recent war and lack of the silvicultural measures in post-war time predispose the trees to diseases and pests that threaten stability of some forest ecosystems today. Most important conifer stands in Bosnia-Herzegovina are in danger. Thus silver-fir (*Abies alba*) is severely attacked by mistletoe *Viscum album* which causes reduction in wood increment and, in the succession of bark beetles (predominantly *Pityocteines curvidens*) or *Armillaria* attack, decline of these forests occur. Spruce (*Picea abies*), second important conifer species in the country, is severely attacked by bark beetles *Ips typographus* and *Pityogenes chalcographus*. Current outbreak of these insects is causing death of many spruce stands.

Key words: *Abies alba*, *Picea abies*, *Ips typographus*, *Pityocteines curvidens*, *Pityogenes chalcographus*, *Viscum album*.

1. Uvod

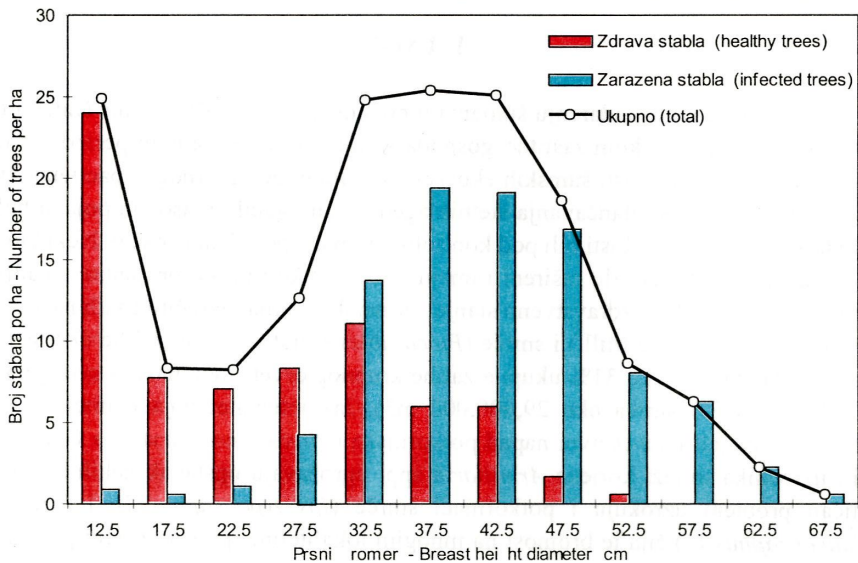
Greške u gospodarenju šumama u prošlosti, a zatim oštećivanje šuma u toku rata, praćeno nedostatkom zaštitno-gospodarskih mjera i u poratnom periodu, uticalo je na slabljenje stabilnosti šumskih ekosistema - njihovog pufernog kapaciteta - što je u prirodnom procesu ulančavanja štetnih agenasa omogućilo masovnu pojavu bolesti i štetnika koji su u prošlosti bili pod kontrolom i imali sporadičan značaj. Neki biotički štetni agensi su danas vrlo rašireni i imaju intenzitet koji prijete opstanku napadnutih šuma. Posebno je loše zdravstveno stanje četinarskih šuma, naročito naših najvažnijih vrsta: jela (*Abies alba* Mill.) i smrče (*Picea abies* Karst.), čije su zalihe drveta 1986. godine (4) iznosile oko 31% ukupne zalihe krupnog drveta svih naših šuma (jela oko 60,400.000 m³ i smrča oko 29,900.000 m³). Jak intenzitet pojave imele (*Viscum album* L.) na jeli i sukcesivni napad potkornjaka (*Pityocteines curvidens* Germ. i dr.) i/ili uzročnika truleži korjena *Armillaria* spp. ugrožavaju opstanak nekih šuma jela. Sličan problem uzrokuju i potkornjaci smrče (*Ips typographus* L. i *Pityogenes chalcographus* L.) čija je brojnost na mnogim lokalitetima prešla kritični prag. Ratni uvjeti i teškoće pri suzbijanju bolesti i štetnika u poratnom periodu, uticali su na formiranje brojnih žarišta koja sada imaju prostornu ekspanziju. U borbi protiv potkornjaka posječene su mnoge vrijedne šume među kojim i neke sjemenske sastojine.

2. Materijal i metod

Procjena zdravstvenog stanja šuma u Federaciji Bosne i Hercegovine vršena je u toku 1997. i 1998. godine i tada je utvrđeno da su mnoge šume jele (*A. alba*) i smrče (*P. abies*) u propadanju uglavnom zbog napada potkornjaka. Radi utvrđivanja realne opasnosti za dalje potrajno gospodarenje ovim šumama izvršena je analiza naših ranijih istraživanja o značaju imele za šume jele, posebno u odnosu na aktuelnu sukcesiju potkornjaka, dok je za šume smrče procjena opasnosti utvrđena novim ogledima na terenu, mjerenjem gustine i dinamike populacije potkornjaka čiji je kalamitet upravo u toku.

2.1. Razvoj imele i sukcesija drugih štetnih biotičkih agenasa

Dosadašnja istraživanja o pojavi imele jele u BiH (5) su pokazala koliko greške u gospodarenju utiču na intenzitet napada ovog parazita. Za ocjenu značaja imele u šumama jele analiziraju se na ovom mjestu neki gospodarski zahvati iz prošlosti i to: poremećaji u debljinskoj strukturi stabala čiste sastojine jele u odjelu 70, g.j. "Staretina-Golija" - Glamoč (površine 35 ha) i uticaj imele na redukciju zapreminskog prirasta u mješovitoj sastojini bukve i jele u odjelu 52a, g.j. "Nemila-Bistričak" - Žepče (površina 39 ha) sa aspekta sekundarnog ulančavanja štetnih biotičkih agenasa. Snimanje je izvršeno na primjernim krugovima površine 100 m², koji su bili postavljeni na kvadratnoj mreži 100x100 m. Na krugovima su izmjerena sva stabla iznad 10 cm prsnog promjera radi utvrđivanja debljinske strukture sastojine, dok je za utvrđivanje prosječnog prirasta na svakom krugu odabrano po jedno zdravo i jedno zaraženo stablo. Pomoću Preslerovog svrdla izmjeren je debljinski prirast u



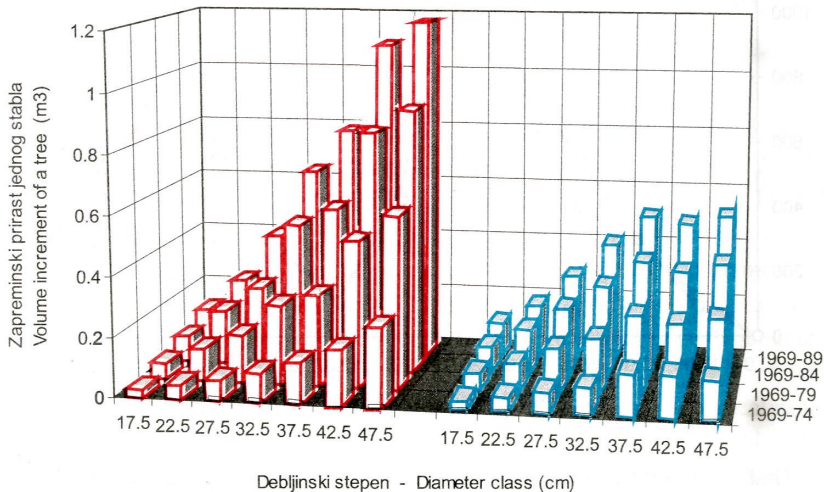
Graf. 1: Debljinska struktura stabala jele (*A. alba*)
Tree distribution of *A. alba* per breast height diameter class
(Odjel 70 g.j. "Staretina-Golija")

posljednjih 20 godina (odvojeno za četiri 5-godišnja perioda), procjenjujući da su u tom periodu napravljene greške u gospodarenju koje su uticale na brz razvoj imele.

2.2. Dinamika i gustina populacije potkornjaka smrče

Radi utvrđivanja dinamike i gustine populacije potkornjaka smrče korišteni su agregacioni feromoni "Fytofarm CZ", iz Češke Republike: PCIT Ecolure za istovremeno primamljivanje *I. typographusa* i *P. chalcographus*-a, i IT Ecolure za primamljivanje samo *I. typographus*-a. Klopke za hvatanje potkornjaka (cjevaste domaće proizvodnje izrađene od plastičnih vodovodnih cijevi promjera 12 cm i dužine 1 m, ili tipa "Ecotrap" - Češka), bile su postavljene u neuređenim sječinama i u šumama loše higijene. Ogledi su izvedeni na više lokaliteta u BiH u toku 1998. godine, ali se ovom prilikom analiziraju samo rezultati istraživanja na lokalitetima u okolini Sarajeva (južni lokalitet Trebević, n.v. 880-1130 m, i sjeverni lokalitet Visojevica, n.v. 1100 m). Unošenje feromona izvršeno je 30. aprila 1998. godine a kontrola ulova potkornjaka vršena je svakih 7-10 dana (posljednja kontrola ulova izvršena je 10. septembra 1998.). Na lokalitetu Trebevića bilo je postavljeno ukupno 8 cjevastih klopki sa feromonima PCIT Ecolure (u 6 klopki) i IT Ecolure (u 2 klopke), dok su na lokalitetu Visojevica bile postavljene tri klopke (dvije cjevaste sa feromonom PCIT Ecolure i jedna "Ecotrap" sa feromonom IT Ecolure. Feromon kesice su postavljene na način kako preporučuje proizvođač, vodeći računa o zaštitnoj udaljenosti do najbližih starijih stabala smrče. Nasjecanje feromon kesica prve serije je obavljeno 05. juna 1998. Feromon kesice prve serije su zamjenjene 13. jula 1998, a nasjecanje feromon kesica druge serije je obavljeno 10. avgusta.

3. Rezultati istraživanja



Hist. 1: Uticaj imele (*V.album*) na zapreminski prirast jele (*A.alba*)

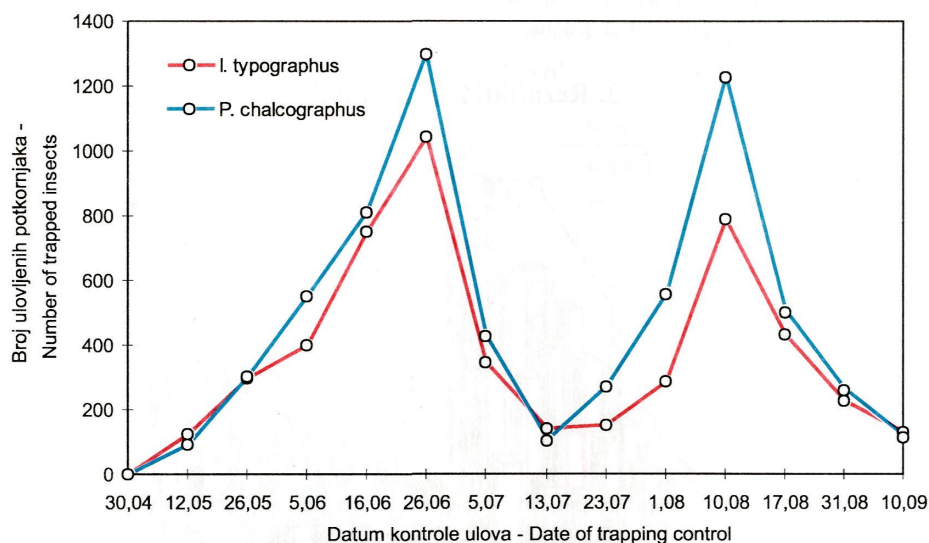
Influence of *V. album* on the volume increment of *A. alba*

(Odjel 52a g.j. "Nemila-Bistričak")

a) Pojava imele *V. album*

Podaci o debljinskoj strukturi čiste sastojine jele u odjelu 70 g.j. "Staretina-Golija" prezentirani u grafikonu 1. pokazuju da je u prošlosti jakim intenzitetom sječe prekinut sklop do te mjere da je omogućen prodor svjetlosti u unutrašnjost šume, što je bio preduvjet za razvoj imele po cijeloj krošnji, kao i na mladim stablima (imela je konstatovana čak i na stablima prsnog promjera od 12.5 cm). Imela se, zatim, brzo širila uzrokujući redukciju prirasta i slabljene opće kondicije stabala, što je za posljedicu imalo ulančavanje sekundarnih insekata i njihovo prenamnoženje ili infekcije gljiva truležnica. Ovi biotički agensi su konačno uzrokovali sušenje stabala.

U histogramu 1. prezentirani su podaci o uticaju *V. album* na redukciju zapreminskog prirasta jele u periodu 1969-89. god. U ovom periodu prirast zdravih stabala očekivano je progresivno rastao sa rastom prsnog promjera, dok je prirast zaraženih stabala počeo da stagnira već kod prsnog promjera od 37.5 cm (što je u vezi sa jačim napadom imele na debljim stablima) i bio je kod debljih stabala više nego dvostruko manji u odnosu na zdrava stabla (20-godišnji zapreminski prirast srednjeg stabla prsnog promjera 47.5 cm iznosio je 1,19 m³ za zdrava, odnosno 0,52 m³ za zaražena stabla). Zaražena stabla sa jako reduciranim prirastom bila su predisponirana za napad drugih štetnih biotičkih agenasa i ubrzo su, zatim, postala žarišta parazita, postepeno su gubila na kvalitetu i prestala plodonositi, što znači da za dalju prirodnu reprodukciju nisu više bila značajna.

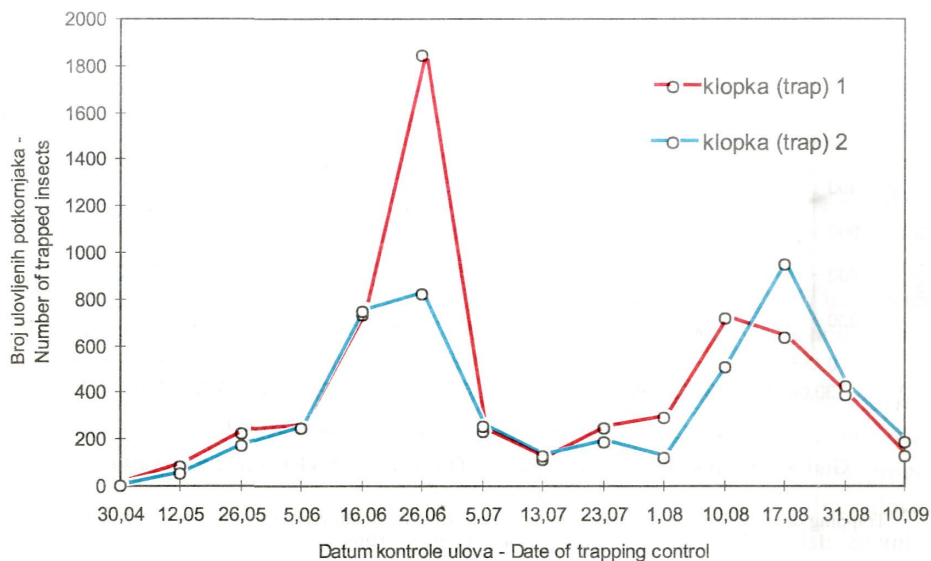


Graf. 2: Dinamika ulova *I. typographus* i *P. chalcographus* feromonom PCIT Ecolure u cjevastim klopnama

Trapping dynamics of *I. typographus* and *P. chalcographus* by pheromone PCIT in pipe-type traps (Trebević, n.v. 1000 m, 1998. g.)

b) Dinamika ulova potkornjaka smrčre

Istraživanja su pokazala da *I. typographus* i *P. chalcographus* imaju dvije generacije na oba lokaliteta. Oba potkornjaka na oba lokaliteta imaju maksimum gusnine populacije prve generacije u drugoj polovini juna, a druge generacije u prvoj polovini avgusta (grafikoni 3-6). Interesantno je napomenuti da se na grafikonima ne prepoznaje sestrinska generacija.



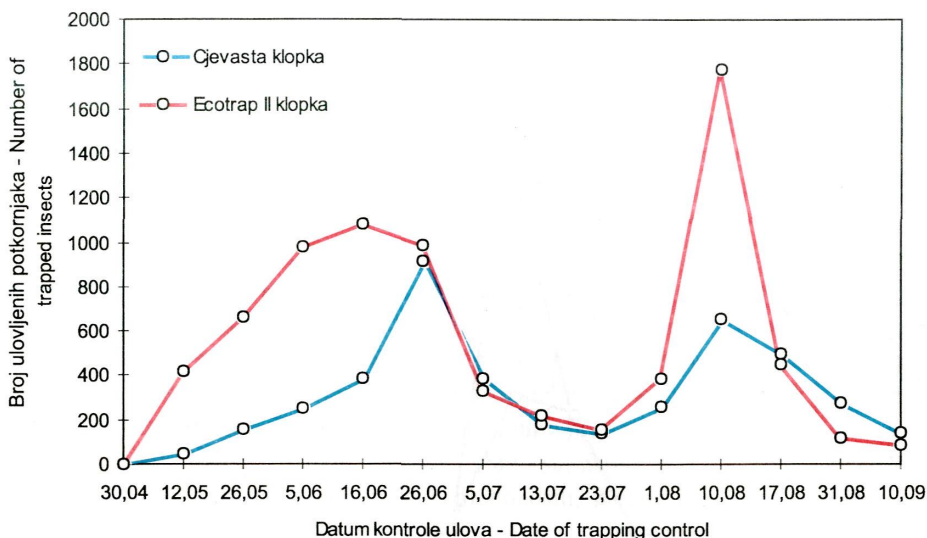
Graf. 3: Dinamika ulova *I. typographus* feromonom IT Ecolureu cjevastim klopka
Trapping dynamics of *I. typographus* by pheromone IT Ecolure in pipe-type traps
(Trebević, n.v. 1000 m, 1998. g.)

- Lokalitet Trebević:

Podaci o efikasnosti PCIT Ecolure na ovom lokalitetima, gdje je ovaj feromon bio postavljen u 6 cjevastih klopki, prezentirani su u grafikonu 2. Ulov *I. typographus*-a iznosio je 1942-3676 jedinki po klopki u prvoj, odnosno 1575-2288 u drugoj generaciji. Treba istaći da je ulov prve generacije ovog potkornjaka u tri klopke bio veći od 3600 jedinki, dok je samo u jednoj klopki ovaj broj bio manji od 2000. Ulov *P. chalcographus* iznosio je 1545-4535 jedinki po klopki u prvoj, odnosno 2255-5399 u drugoj generaciji. U ovom slučaju čak u četiri klopke ulov prve generacije je bio veći od 3800 jedinki, a samo u jednoj klopki manji od 2000 jedinki. Podaci o efikasnosti feromona IT Ecolure u primamljivanju *I. typographus*-a prezentirani su u grafikonu 3. Ulov prve generacije potkornjaka iznosio je po klopki 2424, odnosno 3470 jedinki, dok je druge generacije bilo ulovljeno 2365, odnosno 2400 jedinki. Dobijeni rezultati približno odgovaraju onim dobijenim pri korištenju feromona PCIT Ecolure. Razlike u ulovu potkornjaka između pojedinih klopki su vjerovatno u vezi sa izborom mjesta za postavljanje klopke.

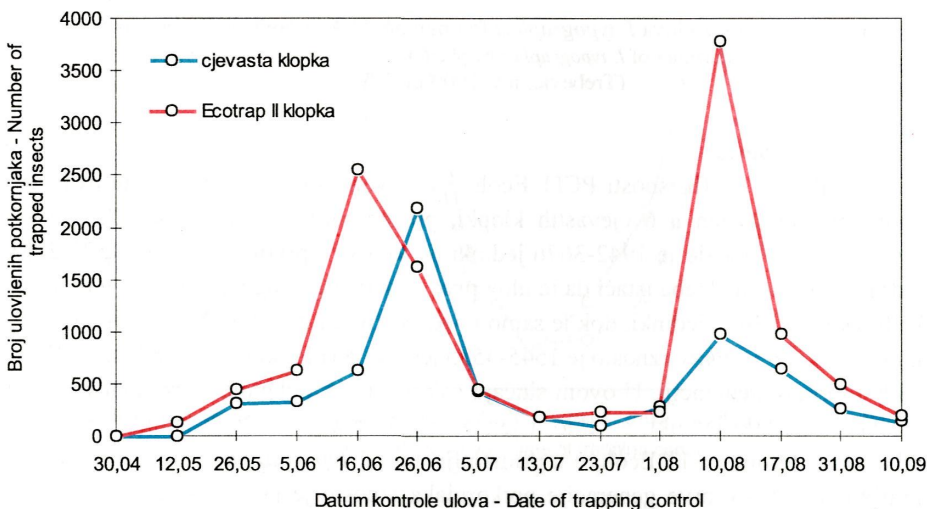
- Lokalitet Visojevica

Na ovom lokalitetu izvršeno je uporedno praćenje efikasnosti feromona PCIT u primamljivanju *I. typographus*-a i *P. chalcographus*-a postavljenog u cjevastoj i Ecotrap klopki. Rezultati su prezentirani u grafikonu 4. i 5. U cjevastoj klopki ulov *I. typographus*-a u prvoj generaciji iznosio je 2333, a u drugoj 1968 jedinki, dok je



Graf.4: Dinamika ulova *I. typographus* feromonom PCIT Ecolure u cjevastoj i Ecotrap klopkama

Trapping dynamics of *I. typographus* by pheromone PCIT Ecolure in pipe-type traps and Ecotrap (Visojevica, n.v. 1100 m, 1998. g.)



Graf. 5: Dinamika ulova *P. chalcographus* feromonom PCIT Ecolure u cjevastoj i Ecotrap klopkama

Trapping dynamics of *P. chalcographus* by pheromone PCIT Ecolure in pipe-type traps and Ecotrap (Visojevica, n.v. 1100 m, 1998. g.)

ulov *P. chalcographus*-a u prvoj generaciji bio 4100, a u drugoj 2422 jedinki. U Ecotrap klopki ulov je bio znatno veći, i za *I. typographus* u prvoj generaciji iznosio je 4689, a u drugoj 2971 jedinki, odnosno za *P. chalcographus* u prvoj generaciji 6026, a u drugoj 5921 jedinki.

4. Diskusija

O uticaju imele na prirast jele pisali su Klepac (3) i Usčuplić (6), dok su se drugi autori ovim problemom bavili općenito. Usčuplić ističe da je pojava imele gospodarski problem i da je u tijesnoj vezi sa intenzitetom sječe. Aktuelni problem širenja imele je u vezi sa nekontrolisanom sječom šuma u toku i nakon rata i nedostatkom higijensko-sanitarnih mjera. Sukcesija potkornjaka dodatno komplikuje zdravstvenu sliku ovih šuma u kojim se, pored imele, formiraju žarišta i pratećih potkornjaka, što ugrožava i susjedne zdrave šume. Značajna redukcija prirasta jele dovodi u pitanje planirano trajanje ophodnje, dok napad potkornjaka zahtjeva radikalnu sječú zaraženih stabala. Mjere koje se u zaštiti ovih šuma trebaju preduzeti mogu da utiču na potrajnost gospodarenja, pri čemu naročito brine pojava imele na tanjim stablima. Zbog toga se preporučuje se da se suzbijanje imele vrši uzgojnim mjerama, postupnim prevođenjem ovih šuma u preborni oblik, što treba da podrazumjeva stalno održavanje zatvorenog sklopa.

Što se tiče potkornjaka smrče *I. typographus*-a i *P. chalcographus*-a u literaturi nema podataka o dinamici njihove populacije tako da su ovo prva istraživanja ove vrste kod nas. Za ocjenu intenziteta napada ovih potkornjaka, što je značajno za prognozu njihove štetnosti, korišteni su kriteriji Titovška (5), prema kojim se broj ulova potkornjaka preko 3500 jedinki u prvoj generaciji smatra kritičnim. Naša istraživanja su pokazala da je na oba lokaliteta u okolini Sarajeva u 1998. bio veći broj potkornjaka od kritičnog praga. Očigledno je u toku kalamitet *I. typographus*-a i *P. chalcographus*-a, na što su uticala ne samo ranije formirana žarišta ovih štetnika, što je bila posljedica ratnih dještava, nego i suša. Očekuje se nastavak gradacije ovih štetnika i tokom 1999. godine. Prema Georgijeviću (2) *I. typographus* se najčešće masovno javlja u šumama izvan optimalne visinske zone prirodne rasprostranjenosti smrče, u pravilu onda kada nastanu jači poremećaji uticajem vanjskih faktora (loša higijena šuma, suša, mehaničko oštećivanje stabala, itd.). Isti autor ističe da je zbog odsustva monitoringa gustina populacije ovog potkornjaka u našim uvjetima uvijek blizu granice štetnosti, tako da je kalamitet potkornjaka moguć i tamo gdje je smrča u optimumu, što potvrđuju istraživanja o pojavi ranijih kalamiteta ovog potkornjaka u Bosni i Hercegovini. Tako, naprimjer, masovna pojava ovog štetnika zabilježena u BiH 1925-1935. g. dovodi se u vezu sa sušom, nekontrolisanom (prekomjernom) eksploatacijom šuma, požarima i šumskim neredom. Tom prilikom je stradalo oko 5,5 miliona m^3 četinarskog drveta, od čega je 79% (oko 4,4 miliona m^3) bila smrča. Fice (1) ističe da je u velikom kalamitetu potkornjaka u četinarskim šumama BiH nakon II Svjetskog rata (1945-1950.) stradalo je oko 3 miliona m^3 četinarskog drveta, od čega je oko 50% bila smrča. U toku pomenuta dva kalamiteta, dakle, stradalo je preko 8 miliona m^3 drvene mase četinarara (od čega smrče preko 6 miliona m^3) što je tada bilo više od 4 godišnja etata četinarskog drveta u BiH (1).

Literatura

1. Fice K. (1960): Proučavanje bionomije potkornjaka i njihovo suzbijanje.- Izvještaj Instituta za šumarstvo i drvenu industriju NR BiH Sarajevo.
2. Georgijević E. (1962): O uticaju nadomorske visine i ekspozicije na pojavu *Ips typographus* L.- Radovi Šumarskog fakulteta i Instituta za šumarstvo i drvenu industriju u Sarajevu, broj 7, str. 109-194.
3. Klepac D. (1955): Uticaj imele na prirast jelovih šuma, Šumarski list 7-9, pp. 231-244, Zagreb.
4. Republički komitet za poljoprivredu, šumarstvo i vodoprivredu BiH (1986.): Dugoročni program razvoja šumarstva u BiH za period 1986-2000. godine.
5. Titovšek J. (1993): Lubadarji lahko uničijo gozdove.- Zveza društev inženirjev in tehnikov gozdarstva in lesarstva Slovenije, Ljubljana.
6. Usčuplić M. (1992.): Uticaj sistema gazdovanja na pojavu imele *Viscum album* L. Glasnik Šum. Fak. Beograd, 74, str. 7-18, Beograd.

Summary

Mistletoe *Viscum album* is wide spread on silver-fir (*Abies alba*) causing over 100% reduction of average volume increment of the infected trees within 42,5 cm diameter class. Silver fir trees of all ages are attacked due to over-cutting in past. In succession attack of some bark beetles (*Pityocteines curvidens* and other) or *Armillaria* root rot fungus occur and they are responsible for final dying of the infected trees. It is considered that only proper management with the silver-fir forests may prevent the occurrence of the mistletoe.

Severe current outbreaks of the bark beetles (*Ips typographus* and *Pityogenes chalcographus*) on spruce (*Picea abies*) are studied. These insects really threat to the existence of spruce stands and some are already clear cut. Experiments on the population dynamics and effect of the pheromones in the bark beetle trappings, in the area of the city of Sarajevo, show that these insects have two generations. First one has its maximum at the beginning of June and second one during the first decade of August. Density of the population of the first generation was over 3500 insects per trap what is considered over the critical threshold.

REGENERACIJA U KULTURI ZRELOG EMBRIJA PANČIĆEVE OMORIKE - *PICEA OMORIKA* (Pančić) Purkinje Regeneration in mature embryo culture of *Picea omorika*

Međedović Safer

Abstract

Induction of adventive buds formation of *Picea omorika* mature embryos have been performed on 1 X MS medium enriched with kinetin and benzylaminopurine testing four combinations of ratio of auxin. Elongation and buds differentiation to adventive shoots have been realised on modified 1/3 MS medium without growth hormones. Multiplication of shoots have been realised by pulsina with kinetin and high content of BA in the medium. Risogenesis of shoots applying IAA (0,125%) under sterile conditions gave positive results in micropropagation of *P. omorika* (success reached up to 50%) what suggest practical possibility of use of this technology in mass production.

1. Uvod

Mogućnost razmnožavanja biljaka *in vitro* kulturom prvi je predvidio Haberlandt još 1902, ali to, nažalost, nije uspio i realizirati. Tek 1934. godine, kada je White objavio rezultate istraživanja o hranidbenim potrebama biljne ćelije (19), a Gautheret svoja istraživanja o trajnim kalusnim kulturama (7), mogli su Murashige i Scoog da sastave hranidbeni medij (16) na kome je bilo moguće regenerirati iz dijela tkiva kompletne biljke duhana, što je napravilo revoluciju u ovoj oblasti i dalo osnov da se metodi i tehnike *in vitro* kultura učvrste u repertoar bioloških metoda za razmnožavanje biljaka.

Od pojave prve podloge za kompletno regenerisanje biljaka do 1974. godine na području *in vitro* kultura drvenastih vrsta objavljeno je tridesetak radova.

Posljednjih godina metodi i tehnike *in vitro* kultura drvenastih vrsta rapidno su napredovale. Aktualnosti na razradi novih metoda i postupaka doprinijele su pojave sve žešćeg sušenja šuma, propadanja i nestajanja pojedinih vrsta, kao i široke mogućnosti pomenutih metoda u istraživanju biotehnologije na bazi genetičkog inženjerstva (multiplikacija superiornih i otpornih genotipova, očuvanju germplazme, zaštiti pojedinih genotipova, transferu i multiplikaciji sterilnih hibrida itd.).

P. omorika (Panč.) Purkinje, među drvenastim vrstama našeg područja sa posebnim kvalitetom drveta, visokom otpornošću, te dekorativnim svojstvima zavrjeđuje pažnju istraživanja mogućnosti *in vitro* razmnožavanja. Ona postaje sve više interesanta šumarskoj praksi, pošto gušćom sadnjom obezbjeđuje visoke produktivne mogućnosti.

Pored toga, zbog neracionalnog iskorištavanja biomase i sjemena, te šumskih požara izuzetno su devastirane prirodne populacije ove vrste. Među interesantnim fenomenima treba istaći da ova vrsta pokazuje izuzetnu varijabilnost i sklonost hibridizaciji sa smrčom u parapatričkim sastojinama (14). Sve prethodno izneseno imalo je za cilj uključivanje ove vrste u program dugoročnih istraživanja *in vitro* regeneracije u istraživačkom zadatku Društvenog cilja VII*. Neki od dobivenih rezultata istraživanja ove vrste predmet su i ovog rada.

2. Materijal i metod

Sjeme Pančičeve omorike sakupljeno je iz prirodnih sastojina sa šireg područja areala. Sterilizacija sjemena vršena je 3% vodenim rastvorom Izosan-G (hlorni preparat - Pliva, Zagreb), na magnetnoj miješalici u trajanju od 15 minuta. Nakon toga, sjeme je ispirano 3 - 4 puta u po 100 ml sterilne redestilovane vode. Zatim je sjeme ostavljeno na bubrenje u frižideru tokom 24 sata. Izolacija embrija iz sterilnog nabubrelog sjemena vršena je pod UV lampom komore laminara "Iskra". Embriji su inokulisani na 1/2 i punoj podlozi MS medija (16) sa varijacijom hormona rasta, vitamina, šećera i aktivnog uglja. Uzgajanje embrija u toku prvih 10 dana vršeno je u u tami, a zatim u uslovima fotoperioda od 16 sati osvijetljavanja i 8 sati tame. Osvjetljavanje se odvijalo sa bijelom svjetlošću fluorescentnih lampi (1200-1800 luxa) i deferenciranim spektrom "hortilux" lampi sa dominantnim crvenim spektrom 670 nm, te plavim 460 nm. Nakon faze indukcije adventivnog pupanja u prvoj rekulturi korištena je izmijenjena podloga 1/3 MS medija bez hormona rasta. U fazi izduživanja izdanaka korišten je GA3 giberelin, a pri multiplikaciji izdanaka palsiran je sa BA. Kod zakorjenjavanja izdanaka korištena je podloga sastava mikro- te makroelemenata po Gauteret (7). Isto tako korištena su i vlastita iskustva ožiljavanja reznica u uslovima "*mist propagation*" sistema (15)

3. Rezultati rada

Regeneracija u juvenilnom tkivu Pančičeve omorike istraživana je kroz slijedeće sekvence:

- indukcija adventivnog pupanja,
- rast i razvoj adventivnih izdanaka,
- multiplikacija izdanaka, i
- zakorjenjavanje izdanaka.

Indukcija adventivnog pupanja na tkivu zrelih embriona Pančičeve omorike izazivana je visokim koncentracijama egzogenih hormona: kinetina (KIN) i N-6 benzilaminopurina (BA). Početna kultura zrelog embrija omorike inokulisana je na punom i 1/2 X MS medija sa sadržajem mioinositola (500 mg/l), saharoze (30 g/l), vitamina - tiamin - HCl, nikotinske kiseline i piridoksin - HCl. Pored prethodnog sadržaja

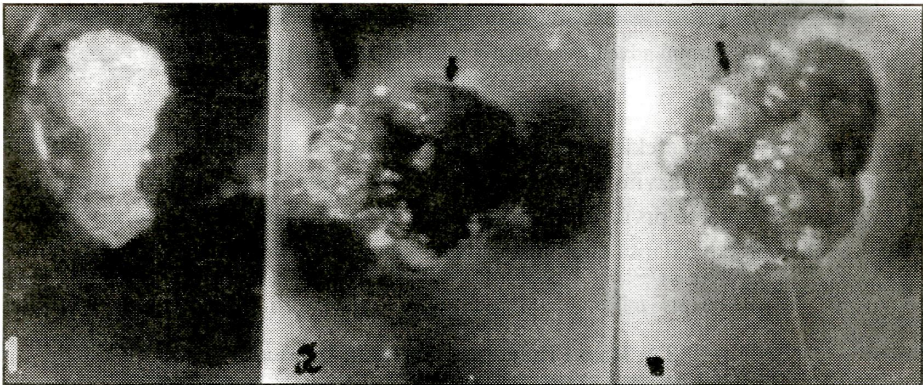
*DC - VII "Multifunkcionalne vrijednosti šumskih ekosistema i njihova zaštita" Programski zadatak: "Razvoj i primjena metoda vegetativnog razmnožavanja nekih četinarara", Javni fond za nauku BiH.

puni i 1/2 x MS medij variran je u četiri kombinacije fitohormona:

- a) KIN 10 μM + IAA 0,05 μM + IBA 0,05 μM
- b) KIN 10 μM + IAA 0,05 μM + NAA 0,05 μM
- c) BA 5 μM + IAA 0,05 μM + IBA 0,05 μM
- d) BA 5 μM + IAA 0,05 μM + NAA 0,05 μM

Pored variranja odnosa auksina i citokinina, testirano je prisustvo aktivnog ugljena sa 0,5% sadržaja i uticaj tame u prvih 10 dana indukcije.

Nakon perioda indukcije adventivnog pupanja (koja je trajala 4 sedmice) provedena je komparativna analiza preživljavanja embrija. Znatno veći procenat preživljavanja imali su u ovoj fazi embriji uzgajani na 1/2 X MS medija. Što se tiče uticaja fitohormona i prisustva aktivnog uglja na fazu preživljavanja embrija, nisu konstatovane neke bitne razlike. Na kraju indukcijske faze na embrijima (koji su uvećali masu) primijećene su i emergencije (Sl. 1) iz kojih će se u daljem postupku razviti primordije i pupovi. Kultura embrija prenesena je nakon 4 sedmice ponovo na podlogu 1/2 X MS bez dodatka fitohormona uz smanjen sadržaj saharoze (15 g/l i mioinositola 100 mg/l).



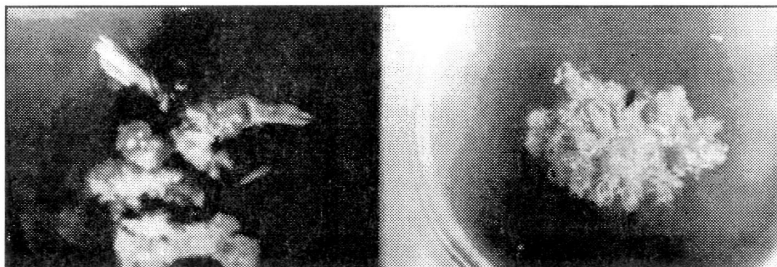
Sl. 1.: Indukcija adventivnog pupanja embrija *P. omorika* na podlozi 1/3 x MS bez hormona

Pri kraju prve rekulture, eksplantati su poprimili loptast izgled na čijoj površini su primjetne jače izražene primordije adventivnih pupova (Sl. 2). U ovoj fazi su se jasno ispoljili efekti fitohormona u procesu indukcije adventivnog pupanja. Naime, u kombinacijama ("b" i "d") koje su sadržale 0,05 μM NAA i IBA došlo je do povećanja proliferacije kalusa, odnosno do manjeg broja začetih adventivnih pupova.

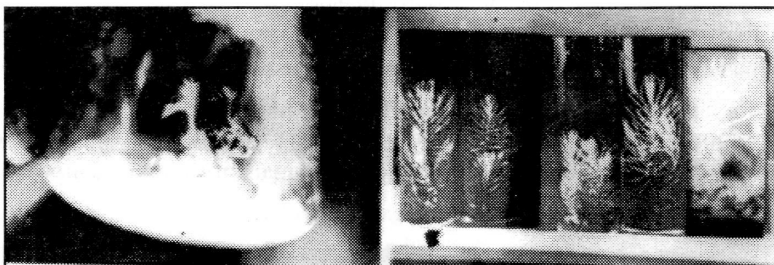
Intenzitet razvoja pupova kao i broj pupova bio je nešto manji kod podloge "c".

Najveći broj pupova (koji se kod nekih embriona kretao i do 30 po jednom embriju) razvio se na podlozi kombinacije hormona "a" (Sl.3).

Efekat prisustva aktivnog uglja u fazi adventivnog pupanja, prema našim istraživanjima, nije imao nikakav bitan uticaj. Značajne razlike u rezultatima indukcije



Sl. 2.: Eksplantati pri kraju prve rekulture

Sl. 3.: Brojni adventivni pupovi u kulturi zrelog embrija *P. omorika* na podlozi "a"

je pokazale su se kod efekta tame u prvih 10 dana početne kulture. Naime, sve primijenjene kombinacije razvile su neuporedivo veći broj pupova kod uslova gajenja kultura u tami za vrijeme prvih 10 dana indukcije. Ovaj podatak vjerovatno je u tijesnoj vezi sa remećenjem balansa citokinin - auksin (zbog fotooksidacije IAA kod kultura u uslovima svjetla).

3.1. Rast i razvoj adventivnih izdanaka

U drugoj rekulturi, kultura embrija je prenesena na podlogu 1/3 X MS bez regulatora rastenja sa GA3 i uslovima osvjetljavanja sa bijelom svjetlošću i svjetlošću "hortilux" lampi. Istovremeno je i kod ove faze rasta i razvoja adventivnih izdanaka dokazana najveća brzina razvoja i rasta kod kombinacije "a". Isto tako vrijedno je istaći, da je daleko brži rast primijećen u uslovima osvjetljavanja "hortilux" lampi, nego kod punog bijelog spektra svjetlosti. Što se tiče testiranja uloge aktivnog uglja u brzini rasta adventivnih izdanaka, može se takođe konstatovati da su kulture sa ugljem imale nešto naglašeniji rast.

3.2. Multiplikacija izdanaka

Izdanci su umnažani metodom poticanja bočnog granjanja.

Ovaj proces stimulisan je regulatorima rastenja, te metodom eliminacije vršnog pupa (apikalne dominacije). Izdanci su inokulisani u posude za gajenje na pod-

lozi 1/2 X MS sa smanjenom koncentracijom saharoze (15 g/l), te na osnovnom mediju MS. U određenom broju kultura testirana je i podloga 1/3 X MS bez hormona rasta.

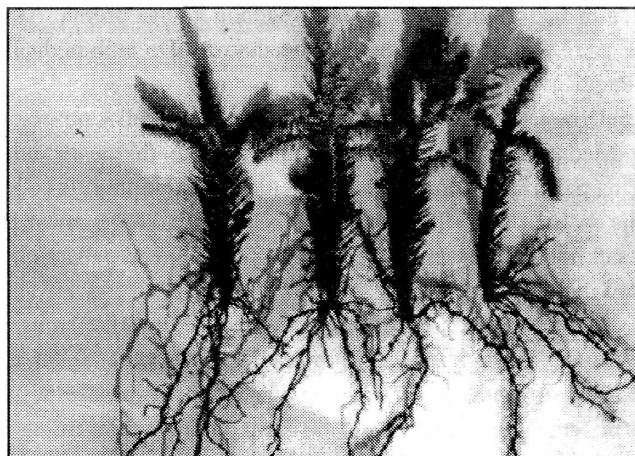
Na podlozi: 10 μ M KIN + 0,05 IAA + IBA poticanje adventivnih izdanaka nakon 30 dana dobiveno je u 60% slučajeva. Nakon 60 dana ovaj procenat peo se i do 75%. Nakon tri mjeseca bočni ogranci su odvajani od matičnog stabla. Na taj način je dobivena prva generacija klonova koji su dalje multiplicitirani u daljem ciklusu umnažanja. Izuzetno dobre rezultate bočnog granjanja dobili smo i kod podloge "a".

Testiranjem bočnog granjanja uz upotrebu citokinina BA te kinetina sa eliminacijom vršnog pupa dobiveni su različiti rezultati koji su zavisili i od početne indukcijske faze. Međutim, rezultati dobiveni primjenom dvije posljednje kombinacije daleko su ispod relativne frekvencije granjanja kod prve dvije kombinacije hormona. Pomoćnim postupkom eliminacije vršnog pupa za tridesetak dana gajenja dobili smo rezultate i do 60% bočnih izdanaka.

3.3. Zakorjenjavanje izdanaka

Regenacija korijena na bazama izdanaka dobivenih *in vitro* kulturom predstavlja krajnju fazu prije adaptacije kompletne biljke. Ova faza rađena je u sterilnim i vansterilnim uslovima. Naime, primjenom svih kombinacija hormona koji utječu na rizogenezu u uslovima sterilnosti nije dalo neke značajnije rezultate. Tako je ostvarena rizogenezna spontanijem pronicanjem korijena na dvadesetak posto individua. Nešto bolje rezultete dala je sterilna podloga sa hormonom rizogenezne i prisustvom esencijalnih elemenata po Gautheret (7).

Ipak najbolje rezultate oživljavanja postigli smo sa izdancima koji su nakon postizanja dužine od 10 cm iznošeni pod "mist propagation" sistem. Ranija iskustva sa reznicama koje navodi Međedović (15) podigli su procenat oživljavanja sa 20%, na nekih 60%. Tako su regenerisane kompletne biljke Pančićeve omorike. Na taj način stekli su se uslovi za dogradnju primijenjenih tehnika za aplikaciju masovne proizvodnje sadnica (Sl.4).



Sl. 4.: Ožiljene reznice *P.omorika* pod "mist propagation" sistemom

4. Diskusija

Polovična koncentracija MS medija djelovala je povoljnije na razvitak embrija Pančičeve omorike u početnoj kulturi i indukciji adventivnih pupova. Na punoj MS podlozi embriji su više kalusirali. Ovo je kod crnog bora uočila Berljak, koja je pomenutu pojavu dovela u svezu sa sastavom hranidbene podloge, odnosno koncentracijom makro- i mikroelemenata (4). Slične navode nalazimo kod eksperimenata koje je izveo Arnold na običnoj smrči (1), te Kolevska na *P. omorika* (13). Egzogeni citokinini uticali su na indukciju adventivnog pupanja, ali i na brzinu razvitka istih, te na broj pupova po embriju. Daleko bolje rezultate u broju adventivnih pupova dobili smo mi nego Arnold u istraživanjima obične smrče. Razlike u efikasnosti pojedinih citokinina počela se uočavati tek u fazi izduživanja pupova u izbojke. Tako je kinetin u koncentraciji 10 μM inducirao veliki broj izbojaka. Tsogas i Bouriquet (18) ustanovili su na embrijima iste vrste NAA u kombinaciji sa BA favorizira razvoj pupova, koje inducira citokinin.

Uzgajanje embrija u prvih 10 dana tame imalo je itekako pozitivne efekte na broj preživljavanja embrija, te kasnije na broj pupova po embriju, kako su primijetili i John i Webb (9). Pojava odlaganja iznošenja kultura na svjetlo za prvih 10 dana takođe je imala za posljedicu povećanje broja pupova i kod *Pinus radiata* navodi Thorpe (17).

Primjenjeni interval 16 satnog osvjetljavanja i 8 časovnog mraka dalo je još bolje rezultate kod uzgajanja embrija u uslovima naglašenog crvenog svjetla, što su kod smrče takođe primijetili Tsogas i Bouriquet. Kod Pančičeve omorike mi smo dobili slične rezultate korištenjem "hortilux" lampi.

Primjena aktivnog uglja u podlozi za rast i razvoj izdanaka pokazala je izvjesni stimulan samo u rastu, kako je primijetila i Kolevska et. al. (11). Prema Dodds i Robert (6) aktivni ugalj adsorbuje mnoge anorganske i organske molekule koje se javljaju kao intoksikanti u metaboličkim procesima razmijene materija između podloge i uzorka.

Kritičnim faktorom indukcije embriogenog kalusa prema Arnold i Haknan (3) kod obične smrče javila se koncentracija saharoze. Do istih podataka došli smo i mi u testu sa Pančičevom omorikom.

Test palsiranja klijanaca (starih 21 dan) sa 125 μM BA povećalo je broj aksilarnih pupova. Međutim, prema našim nalazima kao bitan faktor u indukciji aksilarnih pupova je dužina palsiranja, kao i vrsta primijenjenog citokinina. Tako je palsiranje od 4,5 sati trajanja sa BA dalo najbolje rezultate. Slične rezultate iznosi Borman (5) za običnu smrču sa klijancima starim 5-7 sedmica. Za razliku od palsiranja autor je primjenjivao aktivnu materiju po principu folijarnog spreja.

Dobivanje prve generacije klonove Pančičeve omorike najuspješnije je bilo na mediju sa 10 μM kinetina, te sa hormonima IAA i IBA u koncentraciji 0,05 μM .

Citokinini su esencijalni za indukciju adventivnih i aksilarnih pupova, ali nakon njihove početne uloge adventivni i aksilarni pupovi u toku daljeg razvoja morali su se prenositi na podloge bez citokinina. Određivanje momenta prenosa pokazalo se takođe kritičnim; jer kod slučajeva preranog rekultivisanja razvijao se mali broj pupo-

va, dok je kod prekasnog rekultivisanja proliferacija tekla u pravcu povećanja kalusa.

Jedna od kritičnih faza u razvoju kompletnih individua Pančičeve omorike je poticanje rizogeneze. Naime, samo nekih 15-20% izdanaka se spontano zakorjenjavalo. Međutim, u daljem toku kod ostalih izdanaka primijenjene su metode oživljavanja pomoću "mist propagation system", te našeg iskustva sa reznicama Medjedović (15). Da je ova faza veoma kritična i kod obične smrče ističu Arnold i Erikson (2).

Kompletne klonirane biljke Pančičeve omorike dobivene su iz juvenilnog tkiva zrelog embrija. Međutim, metodološki postupak trebalo bi prilagoditi tako da se proces mikropropagacije može sprovesti i na adultnom tkivu. Imajući u vidu da ova vrsta u prirodnim sastojinama (posebno na području dodira sa smrčom) hibridizira, očekivati je da bi se ovom metodom mogli multiplicirati pojedini dekorativni ili superiorni genotipovi. U svakom pogledu dosadašnji rezultati istraživanja na Pančičevj omorici daju teorijsku i praktičnu šansu da se ona može umnažati i mikropropagacijskim postupcima.

5. Zaključak

Na modificiranom mediju 1/2 x MS sa četiri kombinacije odnosa auksina i citokinina, regenerisane su kompletne biljke vrste *P. omorika*. Postupak mikropropagacije odvijao se kroz faze:

- indukcije adventivnog pupanja,
- izduživanje i diferencijacija adventivnih pupova u izdanke,
- multiplikacije izdanaka, i
- zakorijenjavanje izdanaka.

Najveći procenat indukovanih pupova ostvaren je na 1/2 x MS medij sa 10 μM KIN + 0,05 μM IAA + 0,05 μM IBA. Pored ove kombinacije, vrlo dobre rezultate dala je i podloga BA 5 μM + IAA 0,05 μM + IBA 0,05 μM . Pored karakterističnog odnosa citokinin - auksin za indukcionu fazu adventivnog pupanja je i tama u prvih 10 dana početne kulture, kao i pojačani intenziteti diferenciranog spektra od 670 i 460 nm. Diferencijacija i izduživanje adventivnih izdanaka odvijalo se na 1/3 x MS mediju sa smanjenim sadržajem saharoze, mioinositola, te potpunog odsusstva fitohormona u podlozi. Multiplikacija izdanaka obezbijeđena je palsiranjem u 0,125 μM rastvora KIN, te dodavanjem 10 μM BA u mediju 1/2 x MS. Rizogeneza izdužnih i umnoženih izdanaka inducirana je na 1/3 x MS mediju sa visokom koncentracijom IAA (0,125 mg/1), odnosno u vansterilnim uslovima pod "mist propagation systemom".

Literatura:

1. Arnold, S. Von (1982) : Factors influencing formation, development and rooting of adventitious shoots from embryos of *Picea abies* L. Karst. Plant. Sci Lett 27: 275-287.
2. Arnold, S. Von & Eriksson, T. (1985): Norway spruce (*Picea abies* L.) in: YSP Bajaj (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 1 (pp 291 - 310) Springer - Verlag, Berlin / Heidelberg.
3. Arnold, S. Von & Hakman, I. (1986): Effect of sucrose on initiation of embryogenic callus

- cultures from mature zygotic embryos of *Picea abies* L. Karst (Norway Spruce). J. Plant Physiol 122 : 261 - 265.
4. Breljak, J. (1984): Vegetativno razmnožavanje crnog bora *Pinus nigra* Arn. U kulturi in vitro. Magistarski rad, Prirodoslovnomatematički fakultet Sveuč. Zagreb.
 5. Borman, CH. (1987): *Picea abies*. In: JM Bonga and DJ Durzan (Eds) Cell. and tissue Culture in Forestry (pp 2-27) Martinus Nijhoff Publishers, Dodrecht.
 6. Dodds, JH & Roberts LW (1985): Experiments in Plant Tissue Culture, Second Edition (pp. 40) Cambridge University Press, Cambridge.
 7. Gautheret, R.J. (1934): Culture du tissu cambial. C.r.Acad.Sci., 198. 2195 - 2196.
 8. Haberlandt, G. (1902): Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Naturwiss, 11, 69-92.
 9. John, A. & Webb, KJ (1987): Sitka spruce (*Picea sitchensis* /Bong/ Carr.) In: Bonga JM, Durzan DJ (Eds) Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol 3 (pp 30-41) Martinus Nijhoff Publishers, Dodresth.
 10. Kolevska-Pletikapić, B. (1982): In vitro studies of callus growth of *Pinus nigra* Arn. I. Effect of some anorganic and organic nitrogen sources. Acta bot.croat., 41: 41- 43. Zagreb.
 11. Kolevska-Pletikapić, B. et al. (1983): Bud and Shoot Formation in Juvenile Tissue Culture of *Pinus nigra*. Silvae Genetica 32: 115-119.
 12. Kolevska-Pletikapić, B. (1987): Vegetativno razmnožavanje četinjača tehnikom kulture tkiva Semearstvo 4-6: 291-294.
 13. Kolevska-Pletikapić & B. Buturović - Đerić, Z. (1995): Regeneration of *Picea omorika* plants via organogenesis. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 41: 189-192
 14. Lakušić, R. & Međedović, S. (1974): Ekološke i genetičke karakteristike vrste *Picea omorika* (Panč.) Purkinje. Zbornik radova sa Simpozijuma od flori i vegetaciji Jugoistočnih Dinarida. Tokovi, Ivograd, br. 9: 235-249
 15. Međedović, S. (1987): Oživljavanje reznica smrče u cilju razvijanja tehnologije masovne proizvodnje sadnica. Šum i prerada drveta , 1-3: 27-32, Sarajevo.
 16. Murashige, T. & Scoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Psysiol Plant 15 : 473 - 499.
 17. Thorpe, TA. (1988): Physiology of bud induction in conifers in vitro. In: Hanover JW and Keathley de (Eds) Genetic Manipulation of Woody Plants (pp 167-184) Plenum Press, New York.
 18. Tsogas, M. & Bouriquet, R. (1982): Propagation de *L. epicaa* par culture in vitro embryos et de plantules. Ann Rech Sylvicloles AFOCEL: 345.
 19. White, Ph. R. (1934): Potentially unlimited growth of excised root tips in a liquid medium. Plant Physiol. 9: 585-600.

S u m m a r y

Complete plants of *Picea omorika* have been regenerated on modified medium 1/2 x MS with four combinations of auxin and cytokinin. Micropropagation procedure has been developed through three phases: (i) induction of adventive bud formation, (ii) elongation and differentiation of adventive buds to shoots, and (iii) multiplication of shoots and rooting.

The highest percentage of induced buds has been realized on 1/2 x MS medium with KIN 10 μ M + IAA 0,05 μ M + IBA 0,05 μ M. BA 5 μ M + IAA 0,05 μ M + IBA 0,05 μ M. For the inductive phase of adventive bud formation in culture besides characteristic of cytokinin and auxin amount, darkness was very important during the first ten days, as well as amplified intensities of differential light spectrum of 670 and 460 nm. Differentiation and elongation of adventive shoots has been performed on 1/3

x MS medium with decreased content of sucrose, myo-inositol and absence of phytohormones in the medium. Shoots multiplication has been provided by pulsing in 0,125 μ M solution KIN + 10 μ M BA in 1/2 x MS medium. Risogenesis of elongated and multiplied shoots has been initiated on 1/2 x MS medium with high concentration of IAA (0,125 mg/l).