

## REGENERACIJA U KULTURI ZRELOG EMBRIJA PANČICEVE 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. Aktuelnosti 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
- zakorijenjavanje izdanaka.

Indukcija adventivnog pupanja na tkivu zrelih embriona Pančičeve omorike izazivana je visokim koncentracijama egzogenih hormona: kinetina (KIN) i N-6 ben-zilaminopurina (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 četinara", Javni fond za nauku BiH.

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

- a) KIN 10  $\mu\text{M}$  + IAA 0,05  $\mu\text{M}$  + IBA 0,05  $\mu\text{M}$
- b) KIN 10  $\mu\text{M}$  + IAA 0,05  $\mu\text{M}$  + NAA 0,05  $\mu\text{M}$
- c) BA 5  $\mu\text{M}$  + IAA 0,05  $\mu\text{M}$  + IBA 0,05  $\mu\text{M}$
- d) BA 5  $\mu\text{M}$  + IAA 0,05  $\mu\text{M}$  + NAA 0,05  $\mu\text{M}$

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).



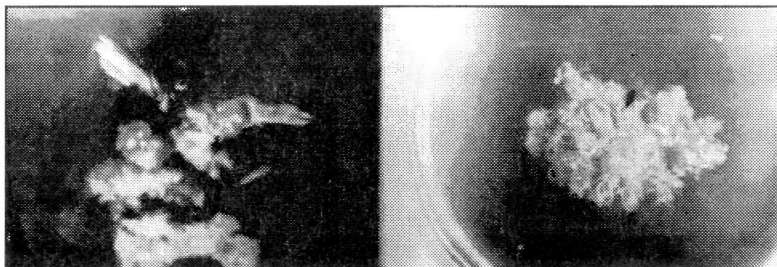
Sl. 1.: Indukcija adventivnog pupanja embrija *P. omorika* na podlozi 1/3 x MS bez hormona

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  $\mu\text{M}$  NAA i IBA došlo je do povećanja proliferacije kalusa, odnosno do manjeg broja začelih adventivnih pupova.

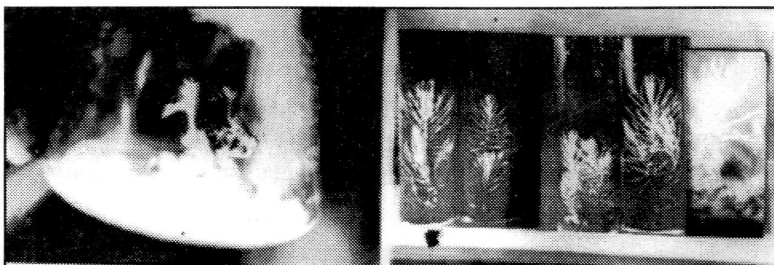
Intenzitet razvoja pupova kao i broj pupova bio je nešto manji kod podloge "c".

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.

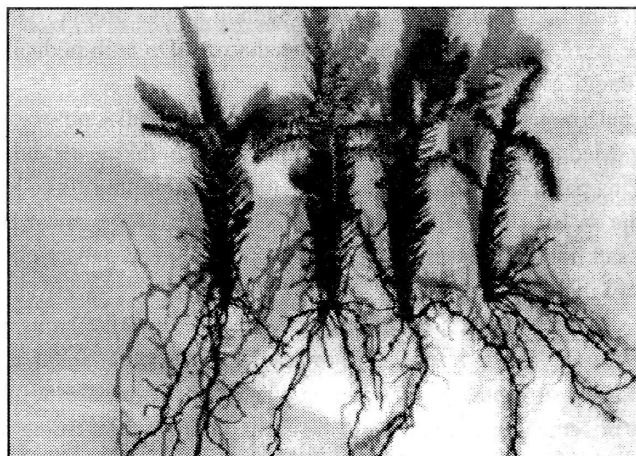
Na podlozi: 10  $\mu$ M KIN + 0,05 IAA + IBA poticanje adventivnih izdanaka nakon 30 dana dobiveno je u 60% slučajeva. Nakon 60 dana ovaj procenat peo se i do 75%. Nakon tri mjeseca bočni ogranci su odvajani od matičnog stabla. Na taj način je dobivena prva generacija klonova koji su dalje multiplicirani 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 rizogeneza spontanijem pronicanjem korijena na dvadesetak posto individua. Nešto bolje rezultate dala je sterilna podloga sa hormonom rizogeneze 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 Pančičeve 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  $\mu\text{M}$  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 razmjene 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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  kinetina, te sa hormonima IAA i IBA u koncentraciji 0,05  $\mu\text{M}$ .

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 zakorjenjava. 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  $\mu\text{M}$  KIN + 0,05  $\mu\text{M}$  IAA + 0,05  $\mu\text{M}$  IBA. Pored ove kombinacije, vrlo dobre rezultate dala je i podloga BA 5  $\mu\text{M}$  + IAA 0,05  $\mu\text{M}$  + IBA 0,05  $\mu\text{M}$ . Pored karakterističnog odnosa citokinin - auksin za indukciju 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 odsustva fitohormona u podlozi. Multiplikacija izdanaka obezbijeđena je palsiranjem u 0,125  $\mu\text{M}$  rastvora KIN, te dodavanjem 10  $\mu\text{M}$  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/l), 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, Dordrecht.
  10. Kolečka-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. Kolečka-Pletikapić, B. et al. (1983): Bud and Shoot Formation in Juvenile Tissue Culture of *Pinus nigra*. Silvae Genetica 32: 115-119.
  12. Kolečka-Pletikapić, B. (1987): Vegetativno razmnožavanje četinjača tehnikom kulture tkiva. Seminarska 4-6: 291-294.
  13. Kolečka-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, Ivangrad, br. 9: 235-249
  15. Međedović, S. (1987): Oživljavanje reznica smrčice 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. Physiol 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. epicaea* par culture in vitro embryos et de plantules. Ann Rech Sylvicoles AFOCEL: 345.
  19. White, Ph. R. (1934): Potentially unlimited growth of excised root tips in a liquid medium. Plant Physiol. 9: 585-600.

## Summary

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  $\mu$ M + IAA 0,05  $\mu$ M + IBA 0,05  $\mu$ M. BA 5  $\mu$ M + IAA 0,05  $\mu$ M + IBA 0,05  $\mu$ 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  $\mu$ M solution KIN + 10  $\mu$ 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).