

**REGENERACIJA KULTIVARA C 104 BURLEY DUHANA
IZ MERISTEMA I PRIMORDIJALNIH LISTIĆA
AKSILARNIH PUPOVA**

**REGENERATION OF BURLEY TOBACCO CULTIVAR C 104 FROM
AXILLARY BUDS MERISTEM AND PRIMORDIAL LEAVES**

Mirna Ćurković Perica

SAŽETAK

U kulturi tkiva primordijalnih listića i vršnih meristema iz aksilarnih pupova C 104 kultivara duhana regenerirane su biljke. Upotrijebljena je MS podloga s dodatkom 30 g/l saharoze, 8 g/l agara, 0,4 mg/l tiamina i riboflavina i 0,3 mg/l IAA i kinetina. U normalne biljke razvilo se 15% nasađenih eksplantata. Biljke su multiplicirane nasađivanjem nodalnih segmenata na MS podlogu istog sastava. Po jedna biljka od svakog klona je aklimatizirana.

UVOD

Najraniji pokušaji uvođenja vršnih meristema u kulturu tkiva bili su u svrhu morfo-genetskih istraživanja. Danas se kultura meristema upotrebljava za brzo klonsko razmnožavanje i za dobivanje biljaka oslobođenih patogena (Tso, 1990). Burk (1975) je eksperimentalno dokazao da se iz eksplantata listova mogu razviti izdanci i regenerirati biljke. Izbor podloge i uvjeta kultiviranja danas više ne predstavlja problem. Međutim, uspješnost kultiviranja uvelike ovisi o izboru eksplantata i biljke davaoca i velike su razlike između kultivara iste vrste (Shabde-Moses i Murashige, 1979). Namjera mi je bila ispitati regenerativnu sposobnost C 104 kultivara Burley duhana u kulturi tkiva, te dobivene biljke umnožiti. Uzgoj u kulturi tkiva, na mediju jednostavnog sastava, mogao bi dati veći broj biljaka, koje bi nakon kratkog razdoblja aklimatizacije mogle rasti u polju.

MATERIJAL I METODE

Aksilarne pupove C 104 kultivara Burley duhana ubrala sam 2.9.1991. na pokusnom polju Duhanskog instituta Zagreb u Božjakovini.

Pupove sam sterilizirala uranjanjem u 70%-tni etanol 10 sekundi, a zatim 0,5%-tni Izosan-G koji je sadržavao 2 kapi Tweena, u trajanju od 10 minuta. Pupove sam zatim ispirala tri puta po 5 minuta u sterilnoj vodi. U aseptičkim uvjetima, pomoću binokularne lupe izolirala sam 4 vršna meristema bez primordijalnih listića, 8 vršnih meristema s 2-3 primordijalna listića i 29 primordijalnih listića različitih veličina. Listiće sam obilježavala brojevima od najmlađeg prema starijim i nasađivala ih tako da je baza lista bila uronjena u hranidbenu podlogu. Nasadila sam 5 drugih, 5 trećih, 7 četvrtih i 12 petih primordijalnih listića. Sve eksplantate nasadila sam na MS podlogu (Murashige i Skoog, 1962), koja je sadržavala 3% saharoze, 0,8% agara, u jednakim koncentracijama tiamina i riboflavina (0,4 mg/l), te biljnih hormona IAA (indolil-3-octena kiselina) i kinetina (0,3 mg/l). pH podloge prilagođen je na 5,7 i podloga je sterilizirana 20 minuta na 121 C i 10 MPa. Kulture sam uzgajala u komori s temperaturom 21-25°C, 14 satnim osvjetljenjem i intenzitetom svjetla od 1000 luxa. Primordijalne listiće koji su na bazi razvili manje listove, ali se ni nakon 70 dana nisu zakorijenili presadila sam na MS podlogu istog sastava, ali sa 1,5% saharoze, kako bih potakla zakorijenjivanje. Sve zakorijenjene biljke umnožila sam nasađivanjem nodalnih segmenata na MS podlogu. Po jednu biljku od svakog klona presadila sam u sterilnu zemlju, pokrila plastičnim vrećicama i tjedan dana zalijevala sterilnom vodom kako bi se biljke aklimatizirale na uvjete uzgoja u klima komori, izvan epruvete.

REZULTATI

Površinska sterilizacija bila je uspješna i 93% eksplantata bilo je sterilno. Nasadila sam 12 vršnih meristema, od toga 8 sa 2-3 primordijalna listića. Meristemi s primordijalnim listićima su se povećavali i nakon 4 tjedna svih 8 diferenciralo se u čaške koje su nastavile rasti do dužine od 1 cm (Sl. 1). Od 4 vršna meristema bez primordijalnih listića, dva su razvila kalus i degenerirani oblik pupa (Sl. 2), a dva su iz kalusa razvili normalne biljčice, koje su se zakorijenile na MS podlozi (Sl. 3). Od 26 uspješno nasađenih primordijalnih listića, biljke su regenerirali drugi, treći i dva četvrta primordijalna listića. Svi stariji listići, njih 12, narasli su na hranidbenoj podlozi do duljine od 3 cm, a nakon 7 tjedana na bazi 5 listića pojavio se kalus. Primordijalni listići od drugog do četvrtog (obilježeni od mlađeg prema starijem) prvo su narasli, a nakon 3-4 tjedna su na bazi plojke razvili

male listiće (Sl. 4). Nakon 45 dana zakorijenili su se jedan drugi i jedan četvrti primordijalni listić. Ostalih 12 presadila sam na podlogu s polovičnom koncentracijom saharoze, nakon čega su se zakorijenila još 2 listića (jedan treći i jedan četvrti).

Sve zakorjenjene biljčice multiplicirala sam tehnikom nasađivanja nodalnih segmenata i od svake dobila 4-7 biljaka. Po jednu zakorjenjenu biljku od svakog klona presadila sam u zemlju. Sve biljke preživjele su aklimatizaciju i normalno rasle (Sl. 5.).

Slika 1. Čaške (0,7-1 cm) diferencirane iz aksijalnih pupova C 104 kultivara Burley duhana, 4 tjedna nakon nasađivanja na MS podlogu

Fig. 1. Calixes (0,7-1 cm) differentiated from Burley tobacco cultivar C 104, 4 weeks after cultivation on MS medium



Slika 2. Kalus i degenerirani, nezakorjenjeni oblik pupa diferenciran iz meristema aksilarnog pupa kultivara C 104

Fig. 2. Callus and degenerated, non-rooted bud differentiated from axillary buds meristem of C 104 cultivar



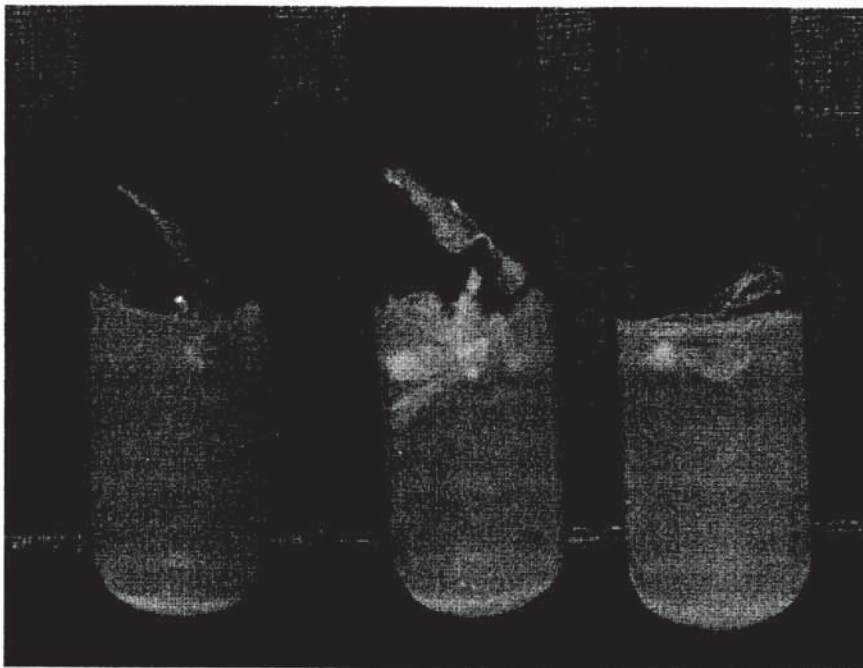
Slika 3. Kalus i normalna biljka Berley duhana diferencirana iz meristema aksilarnog pupa kultivara C 104

Fig. 3. Callus and normal plant of Burley tobacco differentiated from axillary buds meristem of C 104 cultivar



Slika 4. Na bazi primordijalnih listića 25 dana nakon nasađivanja na MS podlogu diferencirali su se mladi listići

Fig. 4. Differentiation of young leaves on the base of primordial leaves 25 days after cultivation on MS medium



Slika 5. Aklimatizirana biljka kultivara C 104

Fig. 5.

Acclimatized plant of C 104 cultivar



DISKUSIJA

Biljni materijal uzet je kasno u sezoni. Zbog toga se većina vršnih pupova razvila u čaške, dok je samo manji dio regenerirao izdanke. Očito je većina aksilarnih pupova već bila u ranoj fazi razvoja cvijeta. Vršni meristemi nasađeni bez primordijalnih listića ponašali su se drugačije od onih nasađenih s primordijalnim listićima. Svi vršni meristemi nasađeni s primordijalnim listićima diferencirali su se u čaške. Shabde i Murashige (1977) otkrili su da su listići koji se pojavljuju i povećavaju glavni izvor hormona, pa je izlučivanje endogenih hormona iz primordijalnih listića vjerojatno imalo ulogu u diferencijaciji pripadajućih meristema u čaške. Egzogeno dodani hormoni imali su veći utjecaj na meristeme bez primordijalnih listića i 50% tih meristema razvilo je normalne biljke. Vjerojatno uzrok rasta vršnog meristema i primordijalnih listića je i veća koncentracija saharoze (3%) i dodatak biljnih hormona (Shabde-Moses i Murashige, 1979).

Nastanak kalusa, a tek zatim zakorjenjivanje poklapa se s podacima u literaturi (Chaplin i Burk, 1979). Reagirali su samo primordijalni listići od drugog do četvrtog, jer su oni imali svojstvo totipotentnosti. Niti jedan stariji listić nije regenerirao biljku. Budući da su biljke koje su se zakorijenile i aklimatizirale bile normalnog izgleda i veličine može se zaključiti da je primijenjena metoda dala prihvatljive rezultate, koji bi bili mnogo bolji da je materijal uzet s mlađih biljaka.

ZAKLJUČAK

Iz 41 nasađenog eksplantata dobiveno je 6 aklimatiziranih biljaka, koje su se normalno razvijale. Za uspješniji uzgoj biljaka iz vršnog meristema potrebno je uzeti materijal s mlađih biljaka. Biljke jednom uvedene u kulturu tkiva mogu se vrlo jednostavno i brzo razmnožiti nasađivanjem nodalnih segmenata na hranidbenu podlogu.

SUMMARY

In the tissue culture, meristem and primordial leaves from axillary buds of C 104 tobacco cultivar were used to regenerate plants. MS medium supplemented with 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 0,4 mg/l thiamin and riboflavin and 0,3 mg/l IAA and kinetin was used. 15% of cultivated explants developed normal plants that were propagated by cultivating stem cuttings on the same MS medium. One plant of each clone was acclimatized.

LITERATURA

- Burk, L. G.** (1975): Clonal and selective propagation of tobacco from leaves. *Plant Sci. Lett.* 4, 149-154
- Chaplin, J. F., Burk, L. G.** (1979): Plant Propagation, pp 28-32. In: Durbin R. D. (ed) *Nicotiana-Procedures for Experimental Use*, US Dept. of Agriculture, Tech. Bull. 1586
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497
- Tso, T. C.** (1990): Techniques for Plant Propagation, pp 217-239. In: Tso T.C. (ed) *Production, Physiology, and Biochemistry of Tobacco Plant*, IDEALS Inc. Beltsville, Maryland
- Shabde, M. N., Murashige, T.** (1977): Hormonal requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem in vitro. *Amer. J. Bot.* 64, 443-448
- Shabde-Moses, M., Murashige, T.** (1979): Organ culture, pp 40-51. In: Durbin R. D. (ed) *Nicotiana-Procedures for Experimental Use*, US Dept. of Agriculture, Tech. Bull. 1586

Zahvala

Zahvaljujem dr Juri Belji na ustupljenom biljnom materijalu.

Adresa autora - Author's address:

Mirna Ćurković Perica
Duhanski institut Zagreb
Planinska 1, Zagreb

Primljeno: 15. 10. 1992.