

DJELOVANJE 2-NAFTOKSI OCTENE KISELINE
I 2,4-DIKLOROFENOKSI OCTENE KISELINE NA
FRAGMENTE TKIVA KOTILEDONA BUNDEVE
(*CUCURBITA PEPO* L.) UZGAJANE IN VITRO*

Sa 14 slika

SIBILA JELASKA

(Iz Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno za štampu 31. 9. 1965.

I. UVOD

Pokušaji kultiviranja tkiva lišća višeg bilja in vitro nisu brojni te o tome ima malo podataka u literaturi. Općeniti podaci dobiveni detaljnijim i potpunijim proučavanjima drugih biljnih tkiva u kulturi mogu se, međutim, posredno primijeniti i na taj materijal. Ako su listovi debeli i mesnati, kao npr. u rodova *Alöe*, *Agave* itd., može se materijal za aseptično nasađivanje uzimati na način kao kod zeljastih stabljika ili se može primijeniti tretman koji se koristi kod mesnatih organa. No ako su listovi mali, treba manipulirati još mnogo opreznije i čak se uzdržati tretmana antiseptičkim sredstvima. To nije teško ako se biljke uzgajaju aseptično iz sjemena, a kojiput je to moguće postići i neposredno, kada su listovi praktično sterilni. Takav je slučaj npr. kod listova kupusa, koji su udruženi u kompaktnu masu čiji unutrašnji listovi nisu pristupačni mikroorganizmima. Tako se sterilni eksplantati mogu dobiti odstranjivanjem vanjskih listova i izrezivanjem okruglih dijelica unutrašnjih listova, čiji dijametar iznosi obično oko 1 cm (De Ropp 1947).

Prema navodima Gauthereta (1959) ne može se dobiti spontana proliferacija lisnog tkiva, jer su njegove stanice relativno jako diferencirane. Vitamini, hidrolizat kazeina i auksini srednje aktivnosti (kao npr. indolil-3-octena kiselina) na ta tkiva ne djeluju. Za dobivanje bujnih kultura treba upotrijebiti supstance dijeljenja jakog djelovanja kao npr. paraklorofenoksi octenu kiselinu kombiniranu s ekstraktom

* Izvadak iz magistarskog rada obranjenog na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu dne 29. 3. 1965.

kvasca (Jagendorf, Bonner i Naylor, 1952) ili 2,4-diklorofenoksiotenu kiselinu zajedno s kokosovim mlijekom (saopćenje Nickella i Toponijeve, cit. po Gautheretu 1959.).

Prvi pokušaj dobivanja tkiva iz listova učinio je Haberlandt (1902), no taj je bio bezuspješan kao i pokušaji njegovih sljedbenika. Tek 1927. Rehwald je ustanovio stvaranje kalusa na fragmentima listova boba i graška. Nakon izvjesnog vremena, kada se usavršila tehnika rada kulture tkiva, De Ropp (1946, 1947) uspijeva dobiti proliferaciju dijelova listova kupusa i još nekih drugih biljaka. Na fragmentima se formirao diskretan kalus i korijenje, osobito u području nervature.

God. 1948. Morel je pokušao kultivirati fragmente listova *Parthenocissus tricuspidata*. I on je uočio stvaranje slabog kalusa, koji je potjecao od proliferacije tkiva u području žila. Ovaj razvitak bio je ustanovljen samo u prisustvu auksina. Prema saopćenju Gautherata (1959) slične pokušaje realizirao je Ledingham na fragmentima listova lana, a osobito vrste *Carthamus*, na supstratu koji je sadržavao stimulativne supstance kao npr. indolil-3-octenu kiselinu, adenilnu kiselinu i kokosovo mlijeko. Eksplantati su stvarali kalus koji je mogao biti presađivan.

Nickell (prema pismenom saopćenju) je pribjegavao mješavini stimulativnih supstanca. Primijenio je 2,4-diklorofenoksiotenu kiselinu (2,4-D) i kokosovo mlijeko, i tako dobio stvaranje kalusa na fragmentima listova (*Agava toumeyana*) i kotiledona (*Persea americana*). Jagendorf, Bonner i Naylor (1952) postigli su razvitak fragmenta listova kupusa posluživši se paraklorofenoksiotenom kiselinom i ekstraktom kvasca.

Toponi (1963 a i b) je radila na fragmentima listova žutenice (*Cichorium inthybus*) i dobila pod utjecajem raznih regulatora rasta (kao npr. 2,4-D, indolil-3-octene kiseline ili kinetina, primijenjenih pojedinačno ili u kombinacijama), različita reagiranja tkiva, koje je stvaralo korijenje ili pupoljke. 2,4-D je inducirala proliferaciju generativne zone žila koja je stvarala ksilem i floem u nastavku na već postojeće kribro-vaskularne formacije. Osim toga uz žile se može opaziti organiziranje korijenskog meristema, koji je općenito slabo izražen. Neke stanice žila i mezofila podliježu na kraju hiperhidratacijskoj transformaciji. Ako izostavimo radove s izoliranim listovima pteridofita i njihovim fragmentima, navedeni radovi bili bi — koliko nam je poznato — najznačajniji radovi na kulturi tkiva listova i kotiledona višeg bilja.

U ovom radu nastojali smo istražiti djelovanje 2-naftoksiotene kiseline i 2,4-diklorofenoksiotene kiseline na fragmente tkiva kotiledona bundeve. Jedini rad o kulturi tkiva te biljne vrste, koji je u raspoloživoj literaturi bilo moguće pronaći, je publikacija Hooda (1964), no ona se odnosi na tkivo ploda. O uzgoju izoliranih listova ili kotiledona, čitavih ili fragmenata za vrstu *Cucurbita pepo*, međutim, nisu mogli biti pronađeni nikakvi podaci.

II. MATERIJAL I METODE

Kao materijal na kome su vršeni pokusi uzeti su fragmenti tkiva kotiledona vrste *Cucurbita pepo* L. Dobiveni su isključivanjem sjemenki u aseptičkim uvjetima. Za sterilizaciju sjemenki bundeve upotrebljen je 5⁰/₀-tni »Asepsol« (trgovačko ime, proizv. »Pliva«) koji je u ovom slučaju dao zadovoljavajuće rezultate. Sve operacije su bile vršene pod strogo aseptičkim uvjetima. Sjemenke su bile najprije oprane u 95⁰/₀-tnom etanolu kako bi se otopile neke supstance koje eventualno impregniraju njihove integumente. Ovo je rađeno brzo tako da su sjemenke bile uronjene u etanolu samo par sekundi. Nakon toga oprane su u 5⁰/₀-tnoj otopini »Asepsola« u tikvici po Erlenmeyeru uz često miješanje u trajanju 8 minuta, a onda ispirane u sterilnoj destiliranoj vodi oko desetak puta.

Tako sterilizirane sjemenke prenošene su zatim pincetom između dva sterilna lista filter-papira kako bi bile zaštićene od kontaminiranja mikroorganizama iz zraka. Nakon što su ruke oprane 95⁰/₀-tnim etanolom pomoću sterilnog skalpela i pincete, skinuta im je testa. Oguljene sjemenke prenesene su u sterilne epruvete s vlažnom vatom na dnu i stavljene u termostat kod temperature od 26⁰ C da kliju. Nakon četiri do sedam dana sjemenke su proklijale i bile pogodne za daljnji rad.

Pomoću skalpela odrezan je vršak klice s kotiledonima još u epruveti i onda pomoću pincete prenesen unutar dva lista sterilnog filter-papira. Tu su kotiledoni bili razdvojeni i od njih izbušeni, pomoću bušača za čepove promjera 9 mm, okrugli fragmenti tkiva. Tkivo je bilo uzeto s proksimalnog dijela kotiledona jer je poznato da je baza lista u pogledu rasta najduže aktivna. Tako priređeni fragmenti bili su prenijeti u epruvete s hranjivim medijem. Orijentaciji fragmenata posvećena je posebna pažnja te se strogo vodilo računa o tome da li je bila uronjena u medij proksimalna strana fragmenta kotiledona ili se ona nalazila izvan agara. Veličina upotrebljenih epruveta iznosila je 23 × 200 mm, a količina hranjivog medija 25 ml. U svaku epruvetu bio je nasađen samo jedan eksplantat.

Za pripremu osnovnog medija upotrebljena je voda redestilirana u staklu, mineralna otopina makroelemenata i mikroelemenata po Hellery (1953): KCl-0,750 g; NaNO₃-0,60 g; MgSO₄ · 7 H₂O-0,250 g; NaH₂PO₄ · H₂O-0,125 g; CaCl₂ · 2 H₂O-0,075 g; FeCl₃ · 6 H₂O-1 mg; ZnSO₄ · 7 H₂O-1 mg; H₃BO₄-1 mg; MnSO₄ · 4 H₂O-0,1 mg; CuSO₄ · 5 H₂O-0,03 mg; AlCl₃-0,03 mg; NiCl₂ · 6 H₂O-0,03 mg; JK-0,01 mg (na litru), 3⁰/₀-tna glukoza, aneurin-HCl u konc. 10⁻⁶ i 0,8⁰/₀-tni Bacto agar (Difco). Ovakav sastav hranjive podloge upotrebljen je za kontrolu. Toj su podlozi onda davane tvori rastjenja i tako promatrane razlike u njihovom djelovanju.

Kao regulatori rasta primijenjene su 2,4-diklorofenoksiocetna kiselina (2,4-D, proizvod tvornice »Chromos«, Zagreb) i 2-naftoksiocetna kiselina (»Fluka«, Švicarska). Obje su upotrebljene u nizu koncentracija od 10⁻⁹—10⁻⁵. Medij je imao pH oko 5,6.

Epruvete napunjene hranjivim agarom bile su sterilizirane u Kochovom loncu 3 puta po 35 minuta u razmaku od 24 sata od jedne do druge

sterilizacije. Nakon stavljanja fragmenata tkiva na medij, epruvete su bile zatvorene pamučnim čepom i prekrivene tankom polivinilskom folijom pričvršćenom gumicom. Na taj način bilo je spriječeno prebrzo sušenje medija.

Kulture su držane u termostatu u mraku na temperaturi od 26° C (osim u vrućim danima kada se temperatura dizala i na 27° C). Trajanje svakog pokusa iznosilo je mjesec dana. Svaki pokus bio je rađen najmanje s deset epruveta. Eksplantati su bili nakon završenih pokusa fiksirani u 70%-tnom alkoholu i tako pripremljeni za histološka i anatomska istraživanja.

III. EKSPERIMENTALNI DIO RADA

A. PONAŠANJE FRAGMENTA TKIVA NA MEDIJU BEZ STIMULATIVNIH SUPSTANCA

1. Vanjska morfologija eksplantata

Eksplantati su bili uzgajani na osnovnom mediju, jedanput orijentirani proksimalnom stranom izvan agara, drugi puta zaronjeni proksimalnom stranom u agar.

Prvi puta pokusi su bili postavljeni u proljeće (od 23. III—25. IV 1964), a drugi puta u ljetu (od 22. VI—28. VII 1964). Eksplantati su se ponašali uvijek podjednako i dali iste rezultate. Nakon što su fragmenti kotiledona bili 25 do 30 dana u kulturi, bili su pregledani i na njima su bile zapažene određene promjene. Kako su se oni kod obje orijentacije jednako ponašali, navodimo dobivene rezultate zajedno.

Eksplantati su jasno povećali svoju površinu. Prije stavljanja u kulturu dijametar eksplantata iznosio je 9 mm, a na kraju se povećao u dužinu na 2,5—3 cm i u širinu na oko 1,5 cm (sl. 1). Glavna žila se pojačala i zadebljala. Na proksimalnoj strani nakon osam dana uočile su se na prerezu žila male izbočine koje su rasle u toku kultiviranja. Na kraju su se međusobno stopile tvoreći jastučić kalusa neznatnog volumena. Ubrzo nakon toga iz kalusa se počelo diferencirati korijenje koje je izraslo snažno s brojnim bočnim ograncima prvog i drugog reda (sl. 2).

Dodir s medijem nije inhibirao proksimalnu stranu i ona se ponašala isto ovako kad je bila zaronjena u hranidbenu podlogu. Distalna strana eksplantata pokazivala je, bez obzira da li je bila uronjena u medij ili se nalazila izvan njega, samo pojavu zacjeljivanja rana.

2. Anatomske karakteristike eksplantata

Poprečni prerez kroz nakupinu tkiva, koja se razvila na fragmentu kotiledona uzgajanom in vitro, pokazao je da se on sastoji od parenhimskih stanica i provodnih elemenata koji su prilično brojni (sl. 3). Posljednji mogu biti razvijeni u obliku traheidalnih elemenata (traheida), koji su skupljeni u čvorove, ili mogu biti pojedinačni. Često se oko njih mogu zapaziti slojevi čvrsto vezanih stanica izodijametričnog oblika, koje podsjećaju na kambij i kribroidne elemente.

Parenhimske stanice su okruglastog oblika i puno veće od stanica mezofila u kotiledonu koji nije sađen na medij. Na površini ovakve nakupine, ako se razvija izvan medija, može se zapaziti pojava pseudotalusa. On nije razvijen na čitavoj površini ravnomjerno, već se razvija mjestimično, a sastoji se od kratkih ogranaka koji su sastavljeni od nekoliko stanica. I ove stanice se također mogu lagano povećati, a membrane im često pokazuju nepravilna zadebljanja u obliku kvržica.

Na uzdužnom prerezu kroz takvu nakupinu, uočilo se da se izmjenjuju slojevi stanica različitih volumena. Tako bi se jedan sloj sastojao od stanica čiji je dijametar iznosio oko $82\ \mu$, a drugi od stanica koje su bile vidljivo manje i na kojima se zapažalo da su se tek nedavno dijelile. To je očito posljedica neravnomjernog i neujednačenog dijeljenja stanica u unutrašnjosti tkiva tako da se ove nove nakupine stanica stvaraju na pojedinim mjestima. Često do proliferacije dolazi u području provodnih žila, pa se oko i iznad njih nastavljaju slojevi novonastalog staničja. Unutar takvih slojeva dolazi kasnije do diferenciranja traheida. Na poprečnom prerezu takve pruge može se također vidjeti da su te nove nakupine stanica uklopljene unutar starog staničja. One ne sadrže škrob, ili samo u vrlo malim količinama. Osim u neposrednoj blizini provodnih žila stanice se mogu dijeliti također unutar već postojećeg parenhima ili na površini tkiva. To je posljedica činjenice što je tkivo iz bazalnog dijela kotiledona još mlado te se stanice, koje se nisu još sasvim izdiferencirale, mogu dalje dijeliti.

Treba još spomenuti da se u tom novonastalom tkivu često mogu naći stanice koje su bile podvrgnute hipertrofiji i nakon toga se lignificirale.

Kad je proksimalna strana fragmenta bila uronjena u medij, ponašala se isto kao i izvan njega. Površinske stanice, koje su bile u najbližem dodiru s medijem, pokazivale su pojave disociiranja i hipertrofije. Ovakve stanice mogu biti dugoljaste, produžene ili elipsoidne i različitih veličina.

Na distalnoj strani eksplantata tkivo je ostalo potpuno inaktivno.

B. DJELOVANJE 2-NAFTOKSICTENE KISELINE NA EKSPANTATE

1. Morfološke promjene na eksplantatima

Osnovnom mediju bila je dodavana 2-naftoksiotena kiselina u koncentracijama od 10^{-9} do 10^{-5} . Prvi put pokusi su bili postavljeni u proljeće 1964. godine od početka do sredine aprila. U ovim eksperimentima eksplantati su bili orijentirani proksimalnom stranom izvan medija. Suprotna orijentacija nije bila rađena. Pokusi su bili postavljeni drugi puta 10. augusta. Tada su bile zastupane obje orijentacije, tj. jedanput proksimalna strana izvan agara, drugi puta u agaru.

Kod orijentacije fragmenata kotiledona, gdje je proksimalna strana bila izvan medija, eksplantati su se ponašali na ovaj način:

Najniže upotrebljena koncentracija 2-naftoksiotene kiseline bila je 10^{-9} (0,001 mg/l). Proksimalna strana reagirala je stvaranjem neznatnog

kalusa i jakom rizogenezom. Već nakon osam do deset dana stvara se korijenje. Distalna strana uronjena u medij ostala je sasvim inaktivna. Nakon mjesec do četrdeset dana rezidui su pokazivali na pojedinim mjestima znakove propadanja.

Koncentracija 2-naftoksiotene kiseline 10^{-8} još nije djelovala na stvaranje kalusa. Slabi kalus se razvijao samo na proksimalnoj strani, dok je distalna ostala i dalje inaktivna (sl. 4). No ova koncentracija je utjecala na rizogenezu. Iako su se korjenčići razvili u velikom broju na proksimalnoj strani, bili su kratki i zakočeni u svom razvoju. Morfološki se nisu razlikovali od onih iz kontrole. Nakon nasađivanja na medij fragmenti su se povećali.

Dodatak 2-naftoksiotene kiseline u koncentraciji 10^{-7} djelovao je na tkiva u tom smislu da se kalus stvorio na proksimalnoj strani u obliku jastučića, a na distalnoj neznatni kalus u obliku kvržica na presjeku žila. Nakon nekog vremena kalus razvijen na proksimalnoj strani stvorio je korijenje koje je bilo brojno, no kratko.

Koncentracija 10^{-6} 2-naftoksiotene kiseline već nakon osam dana aktivirala je tkivo na distalnoj strani uronjenoj u medij, tako da je ova stvorila velike nakupine kalusnog tkiva. Novonastale tvorevine su bile bijele do bijeložućkaste boje. Proksimalni dio tkiva također je stvorio neznatne brežuljke kalusa. Korijenje se na proksimalnoj strani izdiferenciralo nešto kasnije (tek oko šesnaestog dana), ali je bilo krhljivo i neznatno. Ako se ono razvilo tako da je zaronilo u medij, naglo se zadebljalo i pokazivalo je anormalnu građu u odnosu na korijenje razvijeno u kontroli. Međutim, ono je ostalo kratko s brojnim kvržicama koje predstavljaju začetke bočnih ogranaka. Znatni broj eksplantata pokazivao je znakove nekroze.

Najviša upotrebljena koncentracija bila je 10^{-5} . Njeno djelovanje bilo je još intenzivnije. Ona nije sasvim inhibirala stvaranje korijenja, ali je ono bilo malobrojno i krhljivo te na pojedinim primjercima abnormalno debelo. Poprečni prerez kroz takav korijen pokazuje da se on sastoji od dva ili više centralnih cilindara koji su ovijeni zajedničkom korom. Čitava rizoderma pokrivena je brojnim korijenovim dlačicama. Distalni dio eksplantata uronjen u medij proliferirao je stvarajući znatne nakupine nediferenciranog staničja. Proksimalna strana je također stvorila više kalusa nego u kontroli. Čitav eksplantat se povećao i ispunio epruvetu. Nakon mjesec dana tkivo je pokazivalo znakove propadanja, što je najvjerojatnije uzrokovano visokom koncentracijom regulatora rasta.

Kod druge orijentacije fragmenata kotiledona, tj. kad je proksimalna strana bila uronjena u medij, opažene su ove pojave:

Prije svega distalna strana, koja je bila izvan medija, ostala je neaktivirana i kod najviših koncentracija te pokazivala samo pojavu zacjeljivanja rana.

Kod koncentracije 10^{-9} 2-naftoksiotene kiseline proksimalna strana uronjena u medij bila je slična kontroli.

Uz koncentraciju 10^{-8} fragmenti tkiva ponašali su se slično, jedino je kalus na proksimalnoj strani bio obimniji. Ako se korijenje razvilo, bilo je jednako kao i u kontroli.

Razrjeđenje 10^{-7} aktivne supstance djelovalo je već energičnije. Proksimalna strana u mediju mnogo je jače proliferirala u odnosu na drugu orijentaciju, tj. kad se nalazila izvan medija, ili od ranjene površine distalne strane u mediju kod iste koncentracije. Korijenje se slabo razvilo.

Koncentracija 10^{-6} snažno je djelovala na proksimalnu stranu (sl. 5). Kvržice koje su se nakon osam dana razvile, i to najprije na površini žila, slile su se zajedno u zajedničku jastučastu tvorevinu čija je debljina bila veća nego kod koncentracije 10^{-7} (sl. 5). Ako se razvilo korijenje, bilo je deblje od uobičajenog, kratko i s brojnim bočnim ograncima.

Kod koncentracije 10^{-5} takav način reagiranja bio je još jače izražen.

2. Anatomske karakteristike novonastalih tvorevina

U pogledu anatomske građe fragmenti uzgajani na mediju s 2-naftoksiocetnom kiselinom ne pokazuju karakteristike koje bi dale dojam da se tkivo ponaša mnogo drugačije nego u kontroli.

Poprečni prerez kroz sredinu eksplantata kod koncentracije 10^{-9} pokazuje da se stare stanice mezofila nisu ništa povećale i da je njihov volumen ostao isti kao i prije stavljanja na medij. Prosječna dužina tih stanica iznosila je 85,8 μ . Na proksimalnoj strani korijenje je bilo inducirano i kod najviših koncentracija, jedino je njihov razvoj bio zakočen. Pri niskim koncentracijama na uzdužnom prerezu nije bilo uočeno stvaranje nekog kambijskog sloja na granici između već postojećeg i novonastalog tkiva, nego se stanice parenhima odjedanput počinju dijeliti i umnažati (sl. 14). Te su stanice čvrsto povezane međusobno i produžene u smjeru proksimalna-distalna strana. Imaju oblik parenhimskih stanica. Unutar takvog tkiva u toku kultiviranja rano dolazi do diferenciranja traheidalnih elemenata. Katkada membrane samo jednolično zadebljavaju. Takvi traheidalni elementi mogu biti udruženi u čvorove, pojedinačni ili rjeđe poredani u nizovima. Uz njih se zapažaju elementi sitastih stanica, međutim, to se ne dešava uvijek. Stanice na površini hipertrofiraju.

Oko čvorova traheida često se mogu zapaziti široki slojevi međusobno čvrsto vezanih stanica malih dimenzija izodijametričnog oblika koje jako slične na embrionalne stanice. Za sada se ustanovilo da su floemski elementi orijentirani prema periferiji eksplantata, a ksilemski prema središtu. Pod utjecajem jačih koncentracija 2-naftoksiocetne kiseline i distalna strana počinje proliferirati te stvarati novo tkivo. Ovo pokazuje iste pojave. Stvara se parenhimsko staničje, čije su stanice djelomično jako rastresito raspoređene i disociirane. Između njih zapažaju se traheidalni elementi, udruženi u čvorove ili pojedinačni i plaže stanica malih dimenzija embrionalnog tipa. U blizini poredane su u pravim nizovima čvrsto povezane stanice kambija. Na uzdužnim presjecima lijepo se vidi da uz provodne sudove dolazi do stvaranja novih stanica od kojih se onda u toku dalje diferencijacije neke ligniziraju. Ove nove stanice dosta

se razlikuju od stanica parenhimskog mezofila po rasporedu i svom obliku. Međusobno su čvrsto povezane i različitih su veličina i oblika, već prema tome u kojem su se pravcu dijelile i na koji način. Stanice koje dodiruju medij disociiraju se za razliku od onih izvan medija. Neke ostaju nepromijenjene veličine, često one embrionskog tipa, a neke se podvrgavaju punjenju staničnim sokom i tako postaju gigantske.

Karakteristično je da su jake koncentracije 2-naftoksiotene kiseline (koncentracije 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5}) aktivirale distalnu stranu fragmenta kad je ona bila uronjena u medij, dok na nju nisu djelovale ako se nalazila izvan medija.

Proksimalna strana fragmenta kotiledona ponašala se jednako kad je bila u dodiru s medijem ili izvan njega. Stvarala bi meristematski parenhim koji se dijelio, ili kambijalno tkivo oko provodnih elemenata koje djeluje aktivno. Jedino u dodiru s medijem stanice su se disociirale i lako odvajale jedna od druge.

C. DJELOVANJE 2,4-DIKLOROFENOKSIOTENE KISELINE NA EKSPLOANTATE

1. Morfološke promjene na eksplantatima

Osnovnom mediju dodavana je 2,4-diklorofenoksiotena kiselina (2,4-D) u istim koncentracijama kao i 2-naftoksiotena kiselina, tj. 10^{-9} do 10^{-5} . Ovaj sintetički mjenjač rasta izvanredno je aktivan stimulator kambijalnog rasta i proliferacije.

Prvi pokusi bili su postavljeni polovinom aprila 1964. i završeni nakon mjesec dana. U ovim eksperimentima fragmenti tkiva bili su orijentirani proksimalnom stranom izvan medija. Druga orijentacija nije bila rađena. Drugi puta pokusi su bili postavljeni 15. jula iste godine. Ispitane su bile obje orijentacije eksplantata.

Kad je proksimalna strana bila izvan medija ponašala se na ovaj način:

Kod najniže upotrebljene koncentracije 2,4-D nailazilo se na iste pojave kao i kod 2-naftoksiotene kiseline. Nakon osam dana na proksimalnoj strani izvan medija pojavile su se male nakupine kalusa na pre-rezu žila i početak stvaranja korjenčića. Distalna strana ostala je neaktivna u toku čitavog kultiviranja. Površina eksplantata se povećala. Iste promjene opažene su na fragmentima tkiva koji su bili držani na mediju sa 2,4-D u koncentraciji 10^{-8} .

U razrjeđenju 10^{-7} 2,4-diklorofenoksiotena kiselina imala je već jače djelovanje na tkiva (sl. 6). Potakla je na rast distalnu stranu koja je počela stvarati nakupine kalusa. Taj je prekrpio čitavu ranjenu površinu u obliku kapice koja je obuhvatila rub prvobitnog tkiva. Na proksimalnoj strani reagiranje tkiva je bilo već poznato: pojavili su se kalus i diferencirani korjenčići, no bili su tanki i neznatni. Ako bi takav korjenčić zaronio u medij, zadebljao bi se i prekrpio brojnim bočnim ograncima, koji su se nazirali u vidu kvržica.

Koncentracija 10^{-6} 2,4-D izazvala je izvanredno jake i velike nakupine nediferenciranog staničja na distalnoj strani tkiva za razliku od

prethodnih koncentracija (sl. 7). Zbog tih jakih proliferacija došlo je do savijanja eksplantata. Na proksimalnoj ranjenoj površini razvio se isto nešto volumniji kalus, no mnogo manji od kalusa na distalnoj.

Najjača koncentracija koja je bila upotrebljena (10^{-5}) još je snažnije djelovala. Tkiva su se sasvim deformirala od brojnih nakupina novonastalog tkiva kao i od rasta samih stanica (sl. 8). Najveće promjene nastale su na distalnoj strani. Eksplantati su dobili izgled kao da su sastavljeni od samih izbočina i nakupina.

Ranjena površina proksimalne strane fragmenta tkiva uronjena u hranidbenu podlogu ponašala se slično kao i kod suprotne orijentacije. Kod koncentracije 10^{-9} ona je na presjeku žila proliferirala stvarajući kalus u obliku malih kvržica iz kojih su se kasnije izdiferencirali korjenčići. Eksplantati su se povećali. Distalna strana ostala je nedirnut. Na koncentraciju 10^{-8} fragmenti su gotovo jednako reagirali. Međutim, na koncentraciju 10^{-7} 2,4-D, tkivo je bilo mnogo osjetljivije. Proksimalna strana je stvorila nakupine nediferenciranog tkiva. Inhibicija korijenja bila je velika. Distalna strana ostala je neaktivna.

Povećanjem koncentracije na 10^{-6} tkivo je u tom smislu još jače reagiralo. Na proksimalnoj strani stvorile su se još veće nakupine, korijenje se ili izdiferenciralo vrlo neugledno ili se uopće nije stvorilo. Distalna strana fragmenta ostala je nedirnut.

Proksimalna rezana površina i bočne strane eksplantata na koncentraciji 10^{-5} 2,4-D jako su proliferirale i skoro su ispunile epruvetu (sl. 9). U toku daljnjeg kultiviranja na pojedinim eksplantatima izdiferenciralo se kratko korijenje negdje na sredini eksplantata dok se ono nije moglo uočiti na proksimalnoj strani u agaru. Sam centar distalne strane ostao je nedirnut. Nakon trideset do četrdeset dana dijelovi tkiva počeli su propadati.

2. Anatomske karakteristike novonastalih tvorevina

Kod niskih i visokih koncentracija 2,4-D primijećeno je da se volumen stanica u centru eksplantata nije povećao i da je ostao otprilike isti kao kod eksplantata koji nisu bili stavljani na hranidbenu podlogu. (Na koncentraciji 10^{-8} prosječna dužina tih stanica iznosila je $92,6\mu$, a širina $66,6\mu$; na koncentraciji 10^{-6} prosječna dužina bila je $75,4\mu$, a širina $57,2\mu$, što znači da ti dijelovi nisu sudjelovali u produženju samog fragmenta tkiva.)

Novonastale nakupine imaju poznatu strukturu. Sastoje se iz parenhima iz kojeg se onda izdiferencira korijenje i traheidalni elementi. Kod koncentracije 10^{-7} novostvorene stanice distalne strane uronjene u medij pokazuju jaku naklonost disocijaciji, a da se pri tom jako ne povećaju. Na mediju, kojem je dodana 2,4-D u koncentraciji 10^{-3} , ranjena površina distalne strane, tj. nakupine koje se pojavljuju na njoj pokazuju da se u parenhimu stvaraju otoci stanica koje su male i slične stanicama vegetacijskog vrška. Na površini proksimalne strane stanice su hipertrofirale, a membrane su im nepravilno zadebljale u obliku kvržica. Inače su pojave slične kao i kod 2-naftoksioctene kiseline.

U novonastalom parenhimu brzo se diferenciraju traheidalni elementi ili pojedinačno ili u obliku čvorova. Tkivo u mediju pokazuje pojavu disocijacije, koja ne mora biti uvijek vezana s hipertrofijom, i to uglavnom na vanjskim dijelovima, tj. u neposrednom dodiru s medijem (sl. 10). Stanice u unutrašnjosti tkiva su kompaktnije i jače povezane.

Dodir proksimalne strane kotiledona s medijem koji je imao različite koncentracije 2,4-D djelovao je povoljno na intenzitet promjena koje su se događale na njezinoj rezanoj površini. Već i kod niskih koncentracija 2,4-D kalus je bio veći nego kad je proksimalna strana bila izvan medija. Proksimalna strana bila je osjetljivija općenito na sve koncentracije nego distalna rezana površina na istima.

Na histološkim preparatima moglo se zapaziti, neovisno o koncentraciji regulatora rasta unutar novonastalog tkiva, diferencijacija traheida ili samo jednolično zadebljale membrane i žile.

Već kod koncentracije 10^{-7} novonastala tkiva sadrže brojne plaže stanica embrionalnog tipa, okružene parenhimskim stanicama uobičajenog izgleda. (Sl. 12. i 13). Površinske stanice u dodiru s hranidbenom podlogom lako se disociraju i odvajaju jedna od druge. U pogledu veličine, stanice embrionalnog izgleda mogu ostati nepromijenjene i nakon disocijacije ili se lagano povećavaju. Parenhimske stanice mogu biti također podvrgnute hipertrofiji pa dolazi do stvaranja gigantskih stanica (sl. 11). Kod tih disociranih stanica mogu se razlikovati po obliku uglavnom dvije vrste stanica. Jedne su jako produžene (i preko 400 μ), dok su druge okruglasta oblika (promjera oko 123—164 μ). Ovakve disociirane stanice mogu biti i lignificirane. Sam parenhim može biti potaknut na diobu i stvarati nove stanice bez nekog prethodnog stvaranja kambija.

Osim tih proliferacija dolazi do dijeljenja također u unutrašnjosti već postojećeg tkiva.

Uspoređujući dobivene rezultate s podacima literature, djelovanje 2-naftoksiocetene kiseline i 2,4-D na fragmente tkiva kotiledona bundeve bilo je istovetno kao i na druga ispitana tkiva. Pomoću ovih dviju supstancija dobila se jaka kalogeneza, a isto tako i fenomeni neoformacije. Ti regulatori rasta pokazali su se i na tom materijalu rizogeničkima. No u isto vrijeme kad su inducirali korijen, oni su kod viših koncentracija i inhibirali njegov kasniji razvitak u tolikoj mjeri da su samo anatomska istraživanja mogla otkriti njegovo prisustvo.

Fragmenti tkiva ponašali su se slično kao i fragmenti nekih zeljastih stabljika uzgajanih in vitro, koji pokazuju znakove strogog polariteta. Njihova aktivnost bila je strogo polarizirana, jednako kao kod stabljike. Distalna strana pokazivala je aktivnost samo u slučaju kad je bila uronjena u medij s dodatkom viših koncentracija regulatora rasta. Ovu pojavu moglo bi se protumačiti polarnim transportom tvari rastenja. Rezultati najnovijih istraživanja takvo bi tumačenje podupirali. Polarni transport auksina već je dugo poznat. Međutim, otkad su Thimann i Leopold (1955, cit. po Reinertu 1964) utvrdili da postoji polarni transport samo kod indolil-3-octene kiseline, dok ga kod

2,4-D nema, prevladalo je mišljenje da i kod drugih sintetičkih tvari rastenja nema polarnog transporta (Van Overbeek, 1956).

Prema najnovijim istraživanjima to gledište treba korigirati. McCready (1963) i McCready i Jacobs (1963) su naime pomoću spojeva markiranih s C^{14} mogli dokazati da postoji u polarnom transportu indolil-3-octene kiseline i 2,4-D vrlo velika sličnost. Nedostatak aktivnosti distalne strane moglo bi se, prema tome, tumačiti odsutnošću akropetalnog transporta 2-naftoksiotene kiseline i 2,4-D kod orijentacije kod koje je bila u agar uronjena proksimalna strana.

Iz svega, dakle, proizlazi da je tkivo kotiledona bundeve materijal koji kao lisno tkivo pokazuje analogno ponašanje kao što ga pokazuje u pogledu reagiranja na jake regulatore rasta (u uvjetima in vitro) i tkivo stabljika niza biljaka.

Na ovom se mjestu najtoplije zahvaljujem prof. dru Zvonimiru Devidéu na savjetima i pomoći koje mi je pružio u toku rada.

Takoder se zahvaljujem Republičkom fondu za naučni rad SR Hrvatske, koji je financiranjem teme »Citofiziologija bilja« omogućio ova istraživanja.

IV. ZAKLJUČAK

U ovom radu istraženo je ponašanje fragmenata tkiva kotiledona vrste *Cucurbita pepo* L. uzgajanog in vitro, bez i s dodatkom stimulatora rasta: 2-naftoksiotene kiseline i 2,4-diklorofenoksiotene kiseline u koncentracijama od 10^{-9} do 10^{-5} .

Tkivo kotiledona uzgajano na mediju, kojem nisu bile dodavane stimulative supstance, stvaralo je na rezanoj površini proksimalne strane diskretan kalus i jako korijenje normalnog izgleda. Čitav fragment tkiva povećao se dvostruko zahvaljujući hipertrofiji stanica mezofila i diobi stanica unutar tkiva, osobito u blizini provodnih elemenata. Medij nije inhibirao aktivnost proksimalne strane i ona se ponašala jednako ako je bila izvan medija ili uronjena u njemu. Distalna strana je kod obje orijentacije pokazivala samo pojavu zacjeljivanja. Bez djelovanja regulatora rasta stanice su pokazivale sklonost hiperhidratacijskoj transformaciji.

Upotrebljeni regulatori rasta 2-naftoksiotena kiselina i 2,4-diklorofenoksiotena kiselina jako su djelovali na tkivo u koncentracijama 10^{-7} , 10^{-6} i 10^{-5} . Tkivo je slično reagiralo na obje supstance. Objе su u tim koncentracijama inhibirale razvitak korijenja, čak i onda kada je ono već bilo začeto, bez obzira da li je proksimalna strana bila uronjena u medij ili se nalazila izvan njega.

Ranjena površina proksimalne i distalne strane fragmenata tkiva kotiledona uronjena u medij proliferirala je stvarajući bujne nakupine nediferenciranog staničja čiji je volumen bio to veći što je koncentracija bila veća. Proksimalna strana bila je osjetljivija i jače je reagirala na supstance u odnosu na distalnu stranu.

Distalna strana fragmenta tkiva nije reagirala na supstance niti u najvećim koncentracijama, ako je bila orijentirana izvan medija.

Histološka istraživanja novonastalih staničnih masa pokazala su da se one sastoje od parenhimskih stanica i provodnih elemenata. Ti su se

elementi pojavljivali skupljeni u čvorove, nizove ili pojedinačno. Osobito su bili brojni pojedinačni traheidalni elementi. Pri visokim koncentracijama stimulatora rasta u novonastalim nakupinama stvaraju se brojni otoci, koji se sastoje od stanica malih dimenzija, sličnim stanicama meristema vegetacijskih tačaka.

Na osnovi izloženih činjenica čini se vrlo vjerojatnim da bi se — s obzirom na to da se tkivo kotiledona vrste *Cucurbita pepo* L. pokazalo osjetljivim na jake regulatore rasta — daljim radom i istraživanjem kombiniranih djelovanja raznih stimulativnih supstanca mogla uzgojiti loza nediferenciranog staničja koja bi se mogla trajno sačuvati kontinuiranim presađivanjem.

V. LITERATURA

- De Ropp, R. S.*, 1946: Studies in the Physiology of Leaf Growth. II. Growth and Structure of the First Leaf of Rye when Cultivated in Isolation or Attached to the Intact Plant. *Ann. Bot.* 10:31—40.
- De Ropp, R. S.*, 1947: Studies in the Physiology of Leaf Growth. IV. The Growth and Behaviour in Vitro of Dicotyledonous Leaves and Leaf Fragments. *Ann. Bot.* 11:439—447.
- Gautheret, R. J.*, 1959: La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. Masson & Cie. Paris.
- Haberlandt, G.*, 1902: Culturversuche mit isolierten Pflanzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math. Nat. Classe*, 111:69—92.
- Heller, R.*, 1953: Recherches sur la nutrition minérale de tissus végétaux cultivés in vitro. Thèse, Paris, 223 p. et *Ann. Sc. Nat. Bot. Vég.* 14:1—223.
- Hood, J.*, 1964: In Vitro Culture of *Cucurbita pepo* Fruit Tissue. *Plant. Physiol.* 39 — Proceedings of the Annual Meetings.
- Jagendorf, A. T., Bonner, D. M. and Naylor, A. W.*, 1952: An Atypical Growth of Cabbage Seedling Roots. I. Morphology, Histology and Induction Conditions. *Bot. Gaz.* 113:334—347.
- Mc Cready, C. C.*, 1963: Movement of Growth Regulators in Plants. I. Polar Transport of 2,4-Dichlorophenoxy-acetic Acid in Segments from the Petioles of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.* 62:3—18.
- Mc Crady, C. C. and W. P. Jacobs*, 1963: Movement of Growth Regulators in Plants. II. Polar Transport of Radioactivity from Indoleacetic Acid-¹⁴C in Petioles of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.* 62:19—34.
- Morel, G.*, 1948: Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Thèse. Paris, 112 p. et *Ann. Epiphyt. N. S.* 14:123—234.
- Reinert, J.*, 1964: Wachstum. *Fortschr. d. Bot.* 26:247.
- Rehwald, C.*, 1927: Über pflanzliche Tumoren als vermeintliche Wirkung chemischer Reizung. *Zeitschrift. f. Pflanzenkrank. Pflanzensch.* 37:65—86.
- Toponi Maria*, 1963a: Sur la culture de fragments de feuilles d'Endive (*Cichorium intybus* L.). *C. R. Acad. sci.* 257:3212—3215.
- Toponi Maria*, 1963b: Action combinée de la kinetine et de l'acide indolylacétique sur la néoformation d'organes par des fragments de feuilles d'Endive (*Cichorium intybus* L.) cultivés in vitro. *C. R. Acad. sci.* 257:3030—3033.
- Van Overbeek, M.*, 1956: Studies on the Relation between Molecular Structure and Penetration of Growth Regulators into Plants. The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances. (Proc. Symp. at Wye College, Univ. London). London, Butterworths Scientific Publication: 205—210.

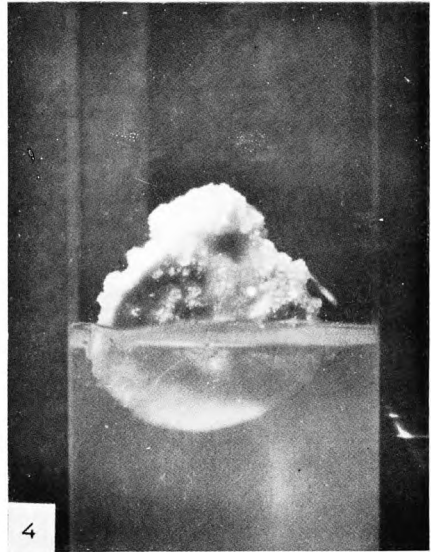
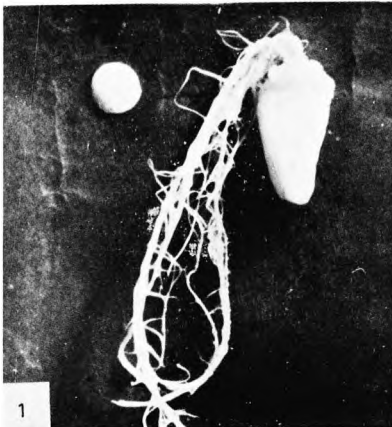
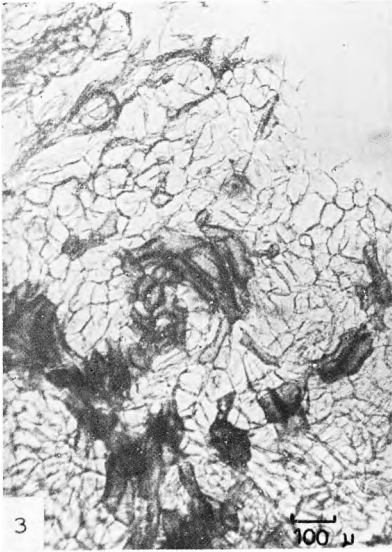


TABLA II

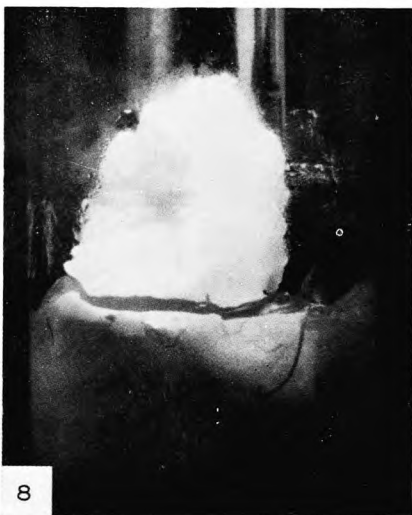
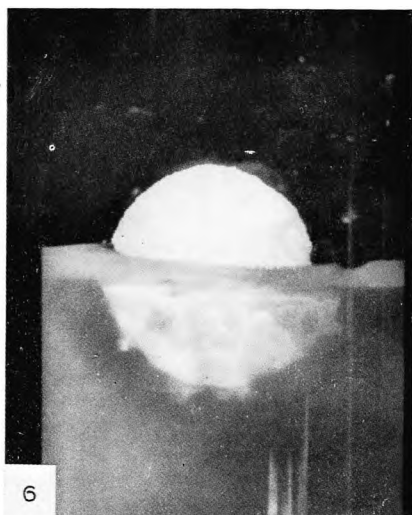
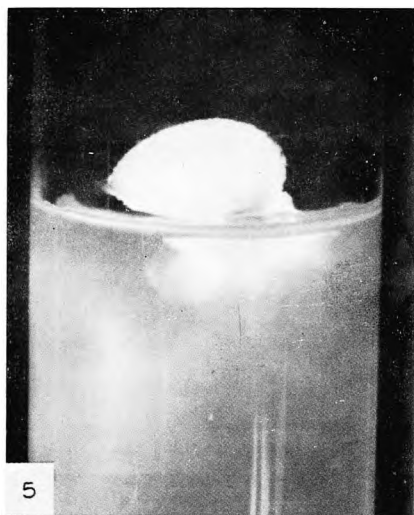


TABLA III

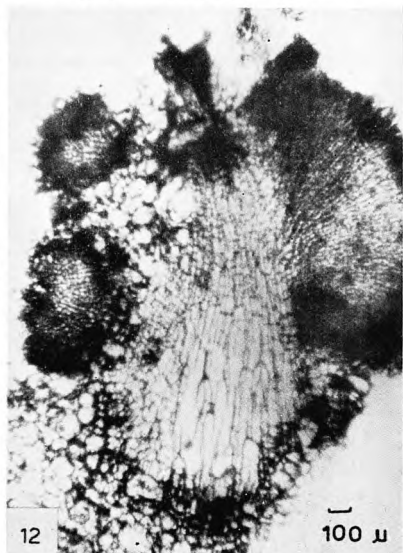
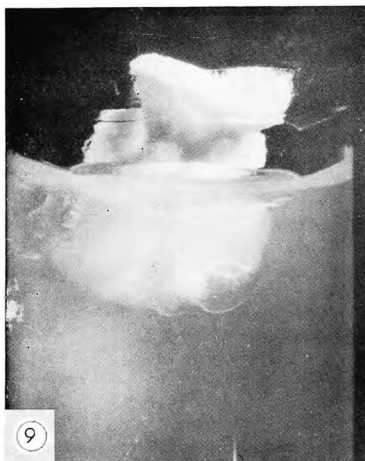
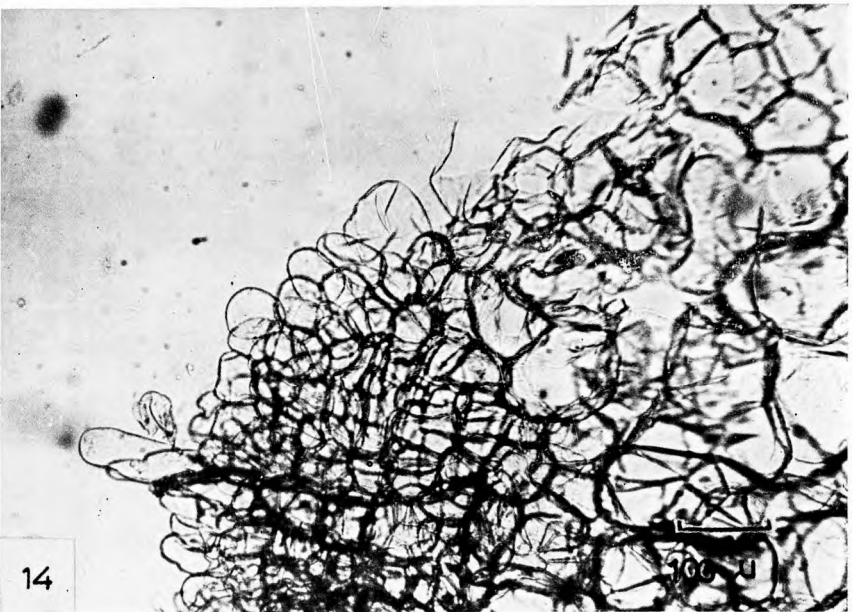
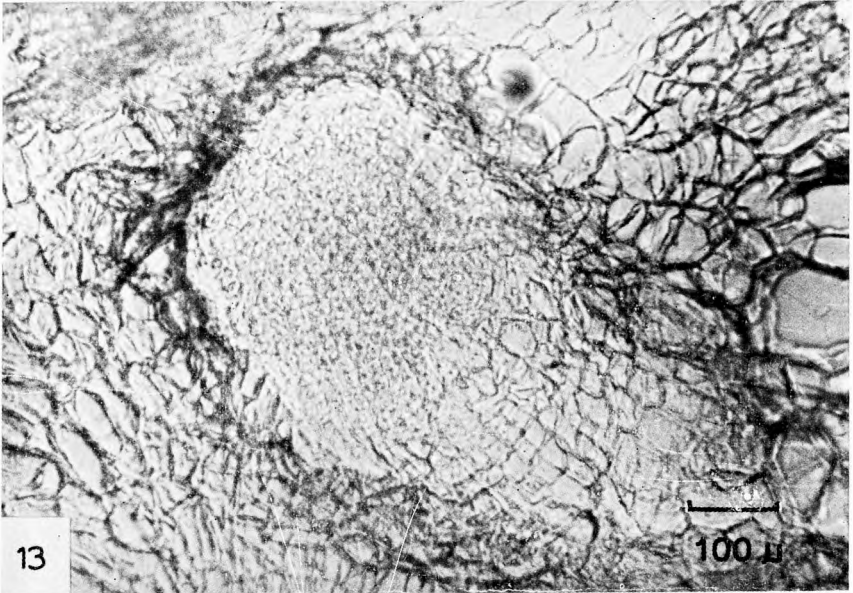


TABLA IV



VI. TUMAČ SLIKA — EXPLANATION OF FIGURES

- Sl. 1. Lijevo: fragment tkiva kotiledona prije stavljanja na hranidbenu podlogu; desno: nakon mjesec dana kultiviranja na mediju bez dodatka regulatora rasta.
- Fig. 1. Left: Cotyledon tissue fragment before the transfer to the nutrient medium; right: after growing one month on the medium without addition of any growth regulator.
- Sl. 2. Fragment tkiva orijentiran proksimalnom stranom izvan agara na kojoj se formirao kalus i jako korijenje. Kultura stara mjesec dana.
- Fig. 2. Tissue fragment orientated with the proximal part outside the medium upon which callus and strong roots were formed. Culture one month old.
- Sl. 3. Kontrola. Poprečni prerez kroz novonastalo parenhimsko tkivo i diferencirane traheide.
- Fig. 3. Control. Cross section through newly formed tissue and differentiated tracheidae.
- Sl. 4. Proksimalna strana izvan agara. Koncentracija 2-naftoksiotene kiseline 10^{-8} . Deset dana stara kultura.
- Fig. 4. Proximal part outside the agar. 2-naphthoxyacetic acid 10^{-8} . Culture ten days old.
- Sl. 5. Proksimalna strana u mediju. Koncentracija 2-naftoksiotene kiseline 10^{-6} . Kultura stara 20 dana.
- Fig. 5. Proximal part in the medium. 2-naphthoxyacetic acid 10^{-6} . Culture twenty days old.
- Sl. 6. Proksimalna strana izvan medija. 2,4-D 10^{-7} . Distalna strana pokazuje aktivnost rastezanja. Deset dana stara kultura.
- Fig. 6. Proximal part outside of the medium. 2,4-D 10^{-7} . Distal side shows growth activity. Culture ten days old.
- Sl. 7. Proksimalna strana izvan medija. 2,4-D 10^{-6} . Kultura stara 20 dana.
- Fig. 7. Proximal part outside the medium. 2,4-D 10^{-6} . Culture 20 days old.
- Sl. 8. Proksimalna strana izvan agara. 2,4-D 10^{-5} . Kultura stara mjesec dana.
- Fig. 8. Proximal part outside of the agar. 2,4-D 10^{-5} . Culture one month old.
- Sl. 9. Proksimalna strana u mediju. 2,4-D 10^{-5} . Kultura stara 20 dana.
- Fig. 9. Proximal part in the medium. 2,4-D 10^{-5} . Culture 20 days old.
- Sl. 10. Nakupina disociiranih parenhimskih stanica na distalnoj strani uronjenoj u medij. 2,4-D 10^{-6} .
- Fig. 10. Clusters of dissociated parenchymatous cells on distal side deeped into the medium. 2,4-D 10^{-6} .
- Sl. 11. Gigantska stanica na proksimalnoj površini fragmenta uronjenoj u medij. 2,4-D 10^{-5} .
- Fig. 11. Giant cell on the proximal surface of the fragment deeped in the medium. 2,4-D 10^{-5} .
- Sl. 12. Poprečni prerez kroz proksimalnu stranu. Nakupina novonastalih meristematskih stanica. 2,4-D 10^{-6} .
- Fig. 12. Cross section through the proximal part. Clusters of newly created meristematic cells. 2,4-D 10^{-6} .
- Sl. 13. Poprečni prerez kroz proksimalnu stranu fragmenta. Proliferacija stanica i stvaranje meristematskih nakupina. 2,4-D 10^{-7} .
- Fig. 13. Cross section through proximal part of the fragments. Proliferation and forming of meristematic clusters. 2,4-D 10^{-7} .
- Sl. 14. Uzdužni prerez kroz proksimalnu stranu eksplantata izvan medija. 2-naftoksiotena kiselina 10^{-9} . Kultura stara mjesec dana.
- Fig. 14. Section through proximal part of the fragments outside the medium. 2-naphthoxyacetic acid 10^{-9} . Culture one month old.

SUMMARY

THE EFFECT OF 2-NAPHTHOXYACETIC ACID AND 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID ON THE COTYLEDON TISSUE OF PUMPKIN (*CUCURBITA PEPO L.*) GROWING IN VITRO

(With 14 figures)

Sibila Jelaska

(Botanical Institute of the University Zagreb)

Received September 30th 1965.

The behaviour of tissue fragments of the cotyledon of the pumpkin (*Cucurbita pepo L.*) cultivated in vitro, with and without the addition of growth regulators 2-naphthoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in concentrations from 10^{-9} — 10^{-5} to the nutrient medium, has been studied.

When cultivated on the standard medium without any addition of growth regulators the tissue of the cotyledon developed a discrete callus and well-developed roots of normal appearance on the cut surface of the proximal part. The whole tissue fragment enlarged twice its volume, owing to hypertrophy of mesophyle cells, and to cell divisions inside the tissue, especially in the neighbourhood of the conducting systems (vessels). The nutritive medium did not inhibit the activity of the proximal side and it behaved equally regardless whether it was oriented upside or downside.

At both orientations the distal side showed only the process of wound healing. In this nutrient medium, having no regulatory substances, the cells showed a tendency to hyperhydrataceous transformation.

The applied growth regulators 2-naphthoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in concentrations of 10^{-7} to 10^{-5} showed striking and similar effects on the growing tissue.

At these concentrations both substances inhibited the development of the roots (even if they had already been preformed) regardless whether the proximal or the distal part was deeped into the medium.

The proximal as well as the distal part of the tissue fragment proliferated well and developed into big masses of undifferentiated tissue the volume of which was the greater the higher the concentration

of the growth regulator employed. The proximal side was more sensitive and reacted more intensely than the distal side.

If the distal side of the tissue fragments was oriented outside of the medium it did not react with the growth substances, even not at their highest concentrations.

The histological investigations of the newly developed cell masses showed that they consist of parenchymatic cells and conducting elements. These elements appeared either associated in clusters, series, or as single cells. Single tracheidal elements were especially frequent. At higher concentrations of growth regulators in the newly developed cell masses, islets consisting of small cells, resembling the cells of vegetative points, were formed. According to all the above facts the tissue of the cotyledon of *Cucurbita pepo* appears to be very sensitive to the strong growth regulators applied. Thus it seems to be very probable that by further investigation of combined effects of different growth regulators it would be possible to obtain a strain of undifferentiated tissue which could be permanently subcultivated.