

DJELOVANJE KONCENTRACIJE AGARA NA
RAST TKIVA KOTILEDONA BUNDEVE
IN VITRO

With Summary in English

SIBILA JELASKA

(Iz Odjela za fiziologiju bilja Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno 8. 4. 1968.

I. UVOD

Osnivači kulture biljnog tkiva ustanovili su da se kolonije tkiva slabo razvijaju na tekućem mediju i zato su se morali uglavnom služiti hranidbenim podlogama učvršćenim agarom. Pokazalo se, međutim, da nečistoće koje bi agar sadržavao, napose mineralne soli, mogu smetati u eksperimentalnom radu, osobito pri istraživanju procesa ishrane. Zbog toga su se ponovno pojavile potrebe kulture na tekućem mediju. Zadovoljavajuće rezultate moglo se dobiti na tekućem mediju kada je bila osigurana prikladna aeracija kolonija, koju su razni istraživači postizavali na razne načine (npr. Heller, 1949, postavljanjem tkiva na površinu otopine pomoću postolja). I nakon toga uspoređivanje razvitka kultura na tekućem mediju i učvršćenom pomoću agara dokazivalo je očito da agar stimulira vrlo jasno proliferanciju (Heller 1951).

Koliko je danas poznato, djelovanje agara sastoji se u neposrednom dodiru s tkivom. Neznatni sloj tekućine između tkiva i agara dovoljan je da nestane stimulacije. Obrnuto, neznatni sloj agara postavljen između hranjive otopine i tkiva dozvoljava rast isto tako dobro kao i sam homogeni agar. Uostalom i upotreba SiO_2 -gela pruža analogne rezultate onima dobivenim s agarom.

Nitsch i Nitsch (1956) su uočili da Difco-agar (vjerojatno zbog svoje čistoće) daje bolje rezultate nego agar u nitima. Upotrebljavajući Difco-agar u koncentraciji od 1% spomenuti autori dobili su najbolji razvitak kolonija. No vjerojatnost ovih rezultata, s obzirom na stimulatvost agara, nije bila prihvaćena bez sumnje. Caplin i Steward (1949, 1952) su, uspoređujući svoje rezultate dobivene na tekućem mediju i rezultate drugih istraživača dobivenih na čvrstim podlogama, posumnjali

u važnost stimulativnog djelovanja agara. Ovo pitanje bilo je osvijetljeno kompletnim istraživanjima White-a (1953), koji je komparirao rast tkiva uzgajanih na površini agarске podloge i tekućem mediju (klasičnom metodom »roller-tube«) težinski te došao do zaključka da je upotreba tekućeg medija pogodnija za studij metabolizma, dok čvrsti medij treba preferirati za održavanje loza.

Nakon stavljanja na hranidbeni medij biljni eksplantat brzo apsorbira vodu. Neki istraživači npr. Reinders (1942), Hackett i Thimann (1952) i dr. proveli su pokuse u tom smislu (kratkog vremenskog trajanja) sa željom da prouče fenomene koji se stvaraju u tkivu prije početka proliferacije. Na temelju toga oni su a priori odbacili utjecaj tih fenomena na apsorpciju vode. Cappelletti (1942, 1947) je izveo pokuse dugog trajanja na fragmentima korijena mrkve, određivajući apsorpciju vode eksplantata, čije su neke regije ostale inertne a druge počele proliferirati. Došao je do interesantnih zapažanja, potvrdivši činjenicu da je postavljanje kulture zaista ovisno o apsorpciji vode. U svojim prvim pokušajima Cappelletti (1942) je ustanovio da su novonastala tkiva bogatija vodom od već postojećih starijih partija. U kasnijim radovima (1947) on je utvrdio obrnuto. Ali se istraživanja drugih autora slažu s njegovim prvobitnim rezultatima (Heller 1953, Goris 1947). Ova su dva istraživača stvarno ustanovila da je hidratacija tkiva u direktnoj vezi s proliferacijom.

Svrha ovog rada bila je utvrditi kako različite koncentracije agara djeluju na tkiva i njihovu apsorpciju vode, a time i na sam njihov rast.

II. MATERIJAL I METODE

Za svoje eksperimente upotrijebili smo bundevu (*Cucurbita pepo L.*), varijetet nepoznat.

a) Priprema i obrada sjemenki bundeve

Probrano sjeme bilo je sterilizirano u otopini kalcijeva hipoklorita (3,5%) dva sata uz stalno miješanje pomoću magnetske mješalice. Nakon toga sjemenke su oslobođene teste i stavljene klijati sterilno u tami na temperaturi od 26—27° C. Nakon četiri do šest dana (prema potrebi) od iskljalih biljaka upotrebljene su za eksperimente okrugle pločice (diskovi) tkiva kotiledona čiji je promjer bio 9 mm. Pločice su prirеđene pomoću oštrog bušača za čepove na proksimalnom dijelu kotiledona. (1/2 mm od baze nalazio se donji rub pločice). Diskovi su uronjeni u medij s prosimalnom stranom jer se pokazala aktivnijom od distalne (Jelaska, 1965).

Kao osnovnu hranidbenu podlogu uzeli smo medij po Helleru* (1953) uz dodatak 3% glukoze i 2 ml parcijalne matične otopine B-vitamina (Wetmore i Rier 1963). Prije autoklaviranja pH medija

Na 1 litru:	NiCl ₂ · 6 H ₂ O — 0,03 mg
*KCl — 0,750 g	KI — 0,01 mg
NaNO ₃ — 0 60 g	FeCl ₃ · 6 H ₂ O — 1 mg
MgSO ₄ · 7 H ₂ O — 0,250 g	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O — 1 mg
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O — 0,125 g	H ₃ BO ₄ — 1 mg
CaCl ₂ · 2 H ₂ O — 0,075 g	MnSO ₄ · 4 H ₂ O — 0,1 mg
AlCl ₃ — 0,03 g	CuSO ₄ · 5 H ₂ O — 0,03 mg

bio je 5,6. Ovako pripremljenoj podlozi bile su dodane odgovarajuće količine agara (Bacto-agar Difco) od 0—1,3⁰/₀, tako da smo obzirom na koncentraciju agara dobili četiri razne vrste medija: tekući medij bez agara te medij s 0,5⁰/₀-tnim, 1⁰/₀-tnim i 1,3⁰/₀-tnim agarom.

Za inokulaciju eksplantata na tekućem mediju poslužili smo se postoljem od kvalitativnog filter-papira prema metodi koju preporuča Heller (1953). Veličina upotrebljenih epruveta iznosila je 23 × 200 mm, a količina hranjivog medija 20 ml. Medij je autoklaviran 20 min kod temp. od 120⁰ C i 1,5 Atm. U svaku epruvetu nasaden je samo jedan eksplantat. Nakon zasijavanja epruvete su bile začepljene pamučnim čepom i staniolskom folijom. Svaki eksperiment obuhvaćao je dva jednaka niza epruveta od kojih je jedan bio izložen tami, a drugi svjetlosti. Svaki pokus bio je načinjen s najmanje deset eksplantata, a rezultati bili su uvaženi samo onda ako su na kraju eksperimenta kulture ostale potpuno zdrave i nezagađene.

Kulture koje su trebale rasti u tami postavljene su u termostat na temp. 26,5 ± 0,5 °C, a one koje su trebale biti osvijetljene, u termostatarani ormar na temp. 26 ± 1 °C u proljeće, a ljeti 28 ± 1 °C sa šesnaestsatnim osvjetljenjem (2 fluorescentne lampe IPR 40 W, 220 V, 8586 °K). Intenzitet osvjetljenja iznosio je 485 ± 45 luksa. Vrijeme trajanja svakog pokusa iznosilo je dvadeset dana. Određivanje rasta eksplantata i njihovog upijanja vode u vezi s različitom koncentracijom agara vršeno je određivanjem prirasta svježje i suhe tvari eksplantata. Za određivanje prirasta svježje tvari primijenjena je metoda vaganja u vrećicama (Heller 1953). Prirast suhe tvari eksplantata određen je vaganjem eksplantata na kraju pokusa nakon što se materijal sušio 24 sata u sušioniku kod temp. od 80—90 °C (Muir, Hildebrandt i Riker 1958).

Dobivene podatke obradili smo statistički pomoću metoda koje preporuča Gautheret (1959).

III. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Rezultati istraživanja prikazani su tabelarno, a odnosi prosječnih vrijednosti grafički.

Oznake u tabelama I do VIII imaju ova značenja (Gautheret 1959): $\Sigma(x)$ = suma vrijednosti pojedine serije; $\Sigma(X)$ = suma vrijednosti svih serija; \bar{x}_n = srednja (prosječna) vrijednost serije; y = faktor korekcije; d = prosječno odstupanje od razlike dviju srednjih vrijednosti; K = broj serija u pokusu; n = broj mjerenja u svakoj seriji; $N = K \cdot n$ = ukupni broj svih mjerenja; σ_c^2 = varijanca kontrole; σ_e^2 = varijanca pogreške; F = kvocjent varijanci $\frac{\sigma_c^2}{\sigma_e^2}$ (F test).

Tabele, označene malim slovom *a* dane su za preglednije (lakše) kompariranje srednjih vrijednosti, a deblje odštampani brojevi u njima su signifikantni s 95⁰/₀-tnom vjerojatnošću.

Tumač slika

Puna linija = prirast težine na eksplantatima raslih u tami, isprekidana linija = prirast težine eksplantata izloženih svjetlosti, T = tekući medij bez agara.

A. PRIRAST SVJEŽE TVARI EKSPLOANTATA

Tabela I — Prirast svježe tvari fragmenata katiledona bundeve u tami bez korijenja (izražen u cg)

		Tekući m.	0,5%	1%	1,3% agara
Epruveta br.	1	36	21	25	14
	2	30	69	32	30
	3	52	47	33	28
	4	47	37	23	26
	5	31	40	31	20
	6	63	70	14	34
	7	73	91	25	25
	8	21	66	27	47
	9	41	53	27	44
	10	53	30	25	49
$\Sigma(x)$		447	524	262	317
x_n		45	52	26	32

$$\Sigma(X) = \Sigma(x) = 1558$$

$$K = 4$$

$$n = 10$$

$$N = K \cdot n = 40$$

$$Kn - 1 = 39$$

$$K - 1 = 3$$

Statistički podaci

$$\Sigma(x^2) = 72340$$

$$\frac{\Sigma(X^2)}{n} = 64352$$

$$y = 60684$$

$$(1) \Sigma(x^2) - y = 11656$$

$$\sigma_c^2 = 1223$$

$$(2) \frac{\Sigma(X^2)}{n} - y = 3668$$

$$\sigma_e^2 = 222$$

$$F = 5,5$$

$$(1) - (2) = 7988$$

$$d = 13,4$$

		T	0,5	1	1,3
		45	52	26	32
T	45	—	7	19	13
0,5	52		7	26	20
1	26			—	6
1,3	32				—

Tabela Ia

Tabela II — Prirast svježe tvari fragmenata kotiledona bundeve u tami zajedno sa korijenjem (izraženo u cg)

		Tekući m.	0,5%	1%	1,3% agara
Epruveta br.	1	106	21	37	14
	2	30	102	49	45
	3	52	83	58	34
	4	48	51	23	43
	5	32	40	52	39
	6	170	198	14	54
	7	139	228	26	48
	8	24	168	27	104
	9	101	86	43	105
	10	128	30	37	100
$\Sigma (\underline{x})$		830	1007	361	586
\underline{x}_n		83	101	36	59

$$\Sigma (X) = \Sigma (x) = 2784$$

Statistički podaci

$\Sigma (x^2) = 301632$	(1) $\Sigma (x^2) - y = 107366$	$\sigma_c^2 = 7800$
		$\sigma_e^2 = 2332$
$\frac{\Sigma (X^2)}{n} = 217667$	(2) $\frac{\Sigma (X^2)}{n} - y = 23401$	F = 3,3
		d = 43,6
$y = 194266$	(1) - (2) = 83965	

	T	0,5	1	1,3
	83	101	36	59
T	83	—	18	47
0,5	101	—	67	42
1	36		—	23
1,3	59			—

Tabela IIa

Tabela III — Prirast svježe tvari fragmenata kotiledona bundeve na svjetlu, bez korijenja (izražen u cg)

		Tekući m.	0,5%	1%	1,3% agara
Epruveta br.	1	50	59	32	53
	2	16	64	56	50
	3	57	54	36	25
	4	49	91	54	68
	5	29	43	53	61
	6	33	60	42	48
	7	51	47	47	61
	8	23	64	22	43
	9	39	100	41	53
	10	16	99	40	57
$\Sigma(x)$		363	681	423	519
\bar{x}_n		36,3	68	42	52

$$\Sigma(X) = \Sigma(x) = 1986$$

Statistički podaci

$$\Sigma(x^2) = 112702$$

$$\frac{\Sigma(X^2)}{n} = 58468$$

$$y = 98605$$

$$(1) \Sigma(x^2) - y = 14097$$

$$(2) \frac{\Sigma(X^2)}{n} - y = 40137$$

$$(1) - (2) = 54224$$

$$\sigma_c^2 = 13380$$

$$\sigma_e^2 = 151$$

$$F = 88$$

$$d = 11,9$$

	T	0,5	1	1,3
	36	68	42	52
T	36	—	32	6
0,5	68	—	26	16
1	42		—	10
1,3	52			—

Tabela IIIa

Tabela IV — Prirast svježe tvari fragmenata kotiledona bundeve na svjetlu zajedno s razvijenim korijenjem (izražen u cg)

		Tekući m.	0,5%	1%	1,3% agara
Epruveta br.	1	101	89	96	75
	2	16	278	129	86
	3	57	61	36	28
	4	49	247	91	146
	5	35	46	139	111
	6	33	79	122	66
	7	51	47	126	110
	8	23	64	22	87
	9	46	240	82	89
	10	16	236	44	98
$\Sigma(x) =$		427	1387	887	1072
\bar{x}_n		43	139	89	107

$$\Sigma(X) = \Sigma(x) = 3773$$

Statistički podaci

$$\Sigma(x^2) = 677267$$

$$\frac{\Sigma(X^2)}{n} = 405205$$

$$y = 355888$$

$$(1) \Sigma(x^2) - y = 321381$$

$$(2) \frac{\Sigma(X^2)}{n} - y = 49317$$

$$(1) - (2) = 272064$$

$$\sigma_c^2 = 16439$$

$$\sigma_c^2 = 7557$$

$$F = 2,2$$

$$d = 68,7$$

T	0,5	1	1,3
43	139	89	107

T	43
0,5	139
1	89
1,3	107

—	96	46	64
	—	50	32
		—	18
			—

Tabela IVa

B. PRIRAST SUHE TVARI EKSPLOANTATA

Tabela V — Prirast suhe tvari fragmenata kotiledona bundeve u tami bez korijenja (izražen u mg)

		Tekući m.	0,5%	1%	1,3% agara
Epruveta br.	1	31	30	33	28
	2	27	69	31	29
	3	55	57	28	25
	4	60	37	39	35
	5	51	41	34	31
	6	62	47	35	26
	7	63	64	35	30
	8	17	59	34	37
	9	26	70	33	40
	10	29	33	22	28
$\Sigma (x)$		421	507	324	309
\bar{x}_n		42	51	32	31

$$\Sigma (X) = \Sigma (x) = 1561$$

Statistički podaci

$$\Sigma (x^2) = 68692$$

$$\sigma_c^2 = 886$$

$$\frac{\Sigma (X^2)}{n} = 63575$$

$$\sigma_e^2 = 142$$

$$y = 60918$$

$$F = 6,2$$

$$(1) \Sigma (x^2) - y = 7774$$

$$d = 10,7$$

$$(2) \frac{\Sigma (X^2)}{n} - y = 2657$$

$$(1) - (2) = 5117$$

	T	0,5	1	1,3
	42	51	32	31
T	42	—	9	10
0,5	51	—	19	11
1	32	—	—	20
1,3	31	—	—	1

Tabela Va

Tabela VI — Prirast suhe tvari fragmenata kotiledona bundeve u tami zajedno s korijenjem (izražen u mg)

		Tekući m.	0,5%	1%	1,3% agara
Epruveta br.	1	73	30	42	28
	2	27	91	43	40
	3	55	75	38	32
	4	60	41	39	44
	5	52	41	43	41
	6	125	102	35	35
	7	98	119	44	39
	8	20	97	33	55
	9	61	84	41	75
	10	73	33	31	65
$\Sigma \bar{x} =$		644	713	389	454
\bar{x}_n		64	71	39	45

$$\Sigma (X) = \Sigma (x) = 2200$$

Statistički podaci

$\Sigma (x^2) = 148318$	$\sigma_e^2 = 2351$
$\frac{\Sigma (X^2)}{n} = 128054$	$\sigma_e^2 = 563$
$y = 121.000$	$F = 4,1$
(1) $\Sigma (x^2) - y = 27318$	$d = 21,4$
(2) $\frac{\Sigma (X^2)}{n} - y = 7054$	
(1) - (2) = 20264	

	T	0,5	1	1,3
	64	71	39	45
T	64	—	7	25
0,5	71	—	32	26
1	39		—	6
1,3	45			—

Tabela VIa

Tabela VII — Prirast suhe tvari fragmenata kotiledona bundeve na svjetlu, bez korijenja (izražen u mg)

		Tekući m.	0,5%	1%	1,3% agara
Epruveta br.	1	53	63	31	44
	2	52	66	43	42
	3	53	68	41	33
	4	50	90	42	53
	5	40	53	36	43
	6	30	56	31	35
	7	86	61	42	43
	8	25	55	29	34
	9	48	90	36	38
	10	9	77	27	30
$\Sigma (x) =$		446	679	358	395
x_n		45	68	96	39

$$\Sigma (X) = \Sigma (x) = 1878$$

Statistički podaci

$$\Sigma (x^2) = 150660$$

$$\Sigma (X^2) = 94414$$

$$y = 88122$$

$$(1) \Sigma (x^2) - y = 62544$$

$$(2) \frac{\Sigma (X^2)}{n} - y = 6292$$

$$(1) - (2) = 56252$$

$$\sigma_e^2 = 2097$$

$$\sigma_e^2 = 1563$$

$$F = 1,3$$

$$d = 35,5$$

	T	0,5	1	1,3
	45	68	36	39
T	45	—	28	9
0,5	68	—	32	29
1	36	—	—	3
1,3	39	—	—	—

Tabela VIIa

Sama rizogeneza fragmenata kotiledona bundeve ovisila je slično kao porast svježe ili suhe tvari samih eksplantata, tj. bila je najjače inducirana na mediju koji je bio učvršćen s 0,5%-tnim agarom.

Tabela VIII — Prirast suhe tvari fragmenata kotiledona bundeve na svjetlu, zajedno s korijenjem (izražen u mg)

		Tekući m.	0,5%	1%	1,3% agara
Epruveta br.	1	82	72	62	60
	2	84	137	85	65
	3	53	73	41	35
	4	50	160	66	98
	5	45	55	76	81
	6	30	65	72	46
	7	91	61	82	82
	8	25	55	29	54
	9	48	182	52	61
	10	9	160	34	56
$\Sigma(x) =$		517	1020	599	638
\bar{x}_n		52	102	60	64

$$\Sigma(X) = \Sigma(x) = 2774$$

Statistički podaci

$$\Sigma(x^2) = 244226$$

$$\frac{\Sigma(X^2)}{n} = 207353$$

$$y = 192377$$

$$(1) \Sigma(x^2) - y = 51889$$

$$\sigma_c^2 = 4992$$

$$(2) \frac{\Sigma(X^2)}{n} - y = 14976$$

$$\sigma_e^2 = 1025$$

$$(1) - (2) = 36913$$

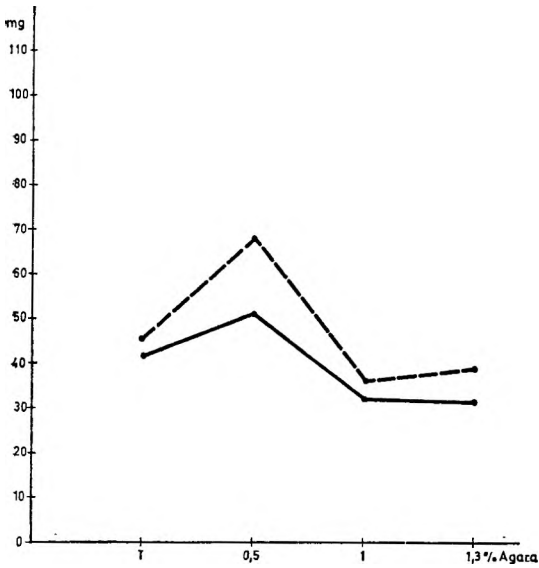
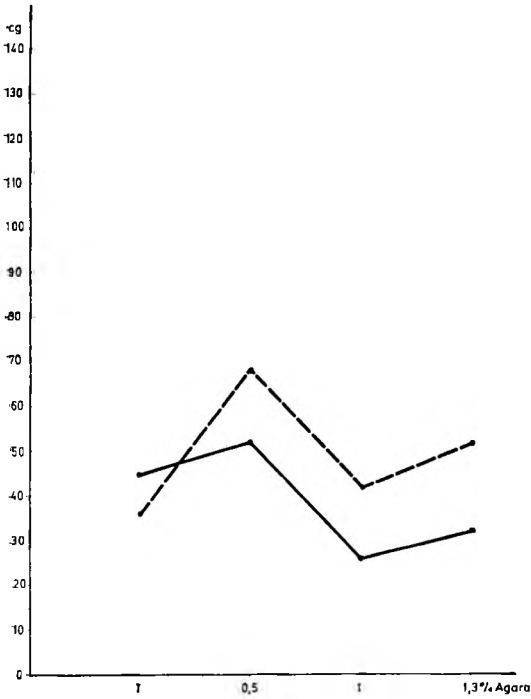
$$F = 4,9$$

$$d = 28,8$$

	T	0,5	1	1,3
	52	102	60	64
T	52	—	50	8
0,5	102	—	42	38
1	60		—	4
1,3	64			—

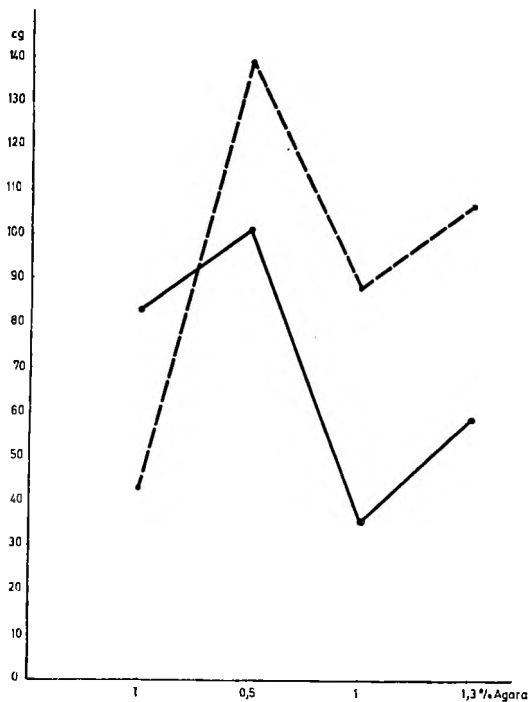
Tabela VIIIa

Sl. 1. Prirast svježe tvari fragmenata kotiledona bundeve bez korijenja

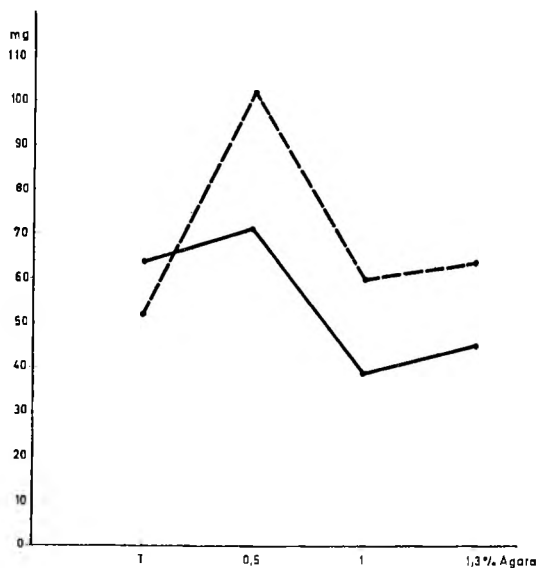


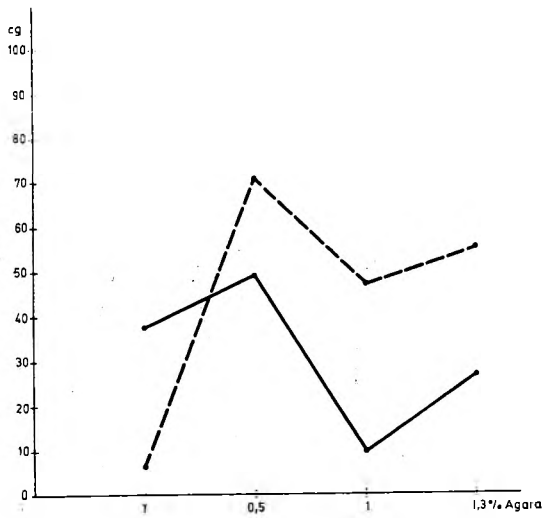
Sl. 3. Porast suhe tvari fragmenta kotiledona bundeve bez korijenja

Sl. 2. Prirast svježe tvari
 fragmenata kotiledona
 bundeve zajedno s kori-
 jenjem

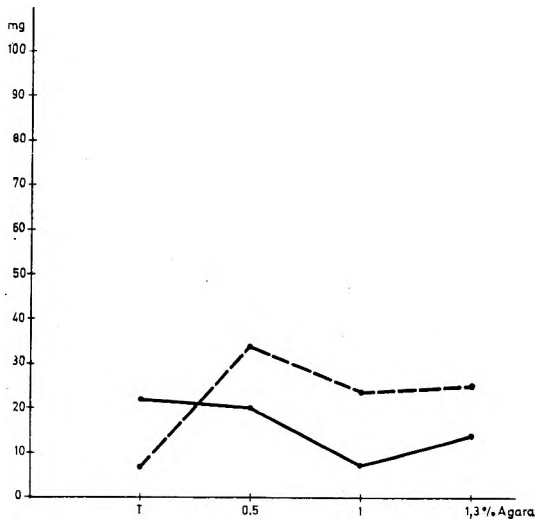


Sl. 4. Prirast suhe tvari
 fragmenta kotiledona
 bundeve zajedno s kori-
 jenjem





Sl. 5. Prirast svježe tvari naraslog korijenja



Sl. 6. Prirast suhe tvari naraslog korijenja

IV. ZAKLJUČAK

Eksplantati tkiva kotiledona vrste *Cucurbita pepo* L. uzgajani su u kulturi na hranjivoj podlozi kojoj je bio dodan agar u koncentracijama od 0; 0,5; 1 i 1,3%. Eksperimenti su bili postavljeni paralelno u tami i na svjetlosti. Određivanje rasta eksplantata — u ovisnosti o različitim koncentracijama agara — vršeno je izračunavanjem prirasta svježe i suhe tvari eksplantata, a dobiveni podaci obrađeni su statistički. Na temelju dobivenih podataka može se zaključiti ovo:

1) Eksplantati kultivirani na svjetlosti pokazuju bolji rast nego pod istim uvjetima u tami.

2) Ta se pojava odnosi kako na prirast svježe tvari tako i na prirast suhe tvari.

3) I rizogeneza eksplantata je na svjetlosti jača nego u tami, pa je ovdje također prirast i svježe i suhe tvari razvijenog korijenja veći na svjetlosti nego u tami.

4) Najveći prirast suhe i svježe tvari utvrđen je kod 0,5%-tne koncentracije agara. Sve krivulje koje prikazuju ovisnost srednje vrijednosti prirasta svježe ili suhe tvari o koncentraciji agara pokazuju sličan oblik time što se od 0%—0,5% prirast povećava, od 0,5%—1% pada, a od 1%—1,3% pokazuje ponovni slabi uspon koji, međutim, u pretežnoj većini slučajeva nije signifikantan.

Dugujem osobitu zahvalnost prof. dr Zvonimiru Devidéu na savjetima koje mi je pružao u toku rada. Također se zahvaljujem Republičkom fondu za naučni rad SR Hrvatske, koji je svojim sredstvima omogućio ova istraživanja.

V. LITERATURA

- Caplin, S. M., and Steward, F. C., 1949:* A technique for the controlled growth of excised plant tissue in liquid media under aseptic conditions. *Nature*, 163.: 920—924.
- Caplin, S. M. and Steward, F. C., 1952:* Investigations on the growth and metabolism of plant cells. II. Variables affecting the growth of tissue explants and the development of a quantitative method using carrot root. *Ann. Bot.* 16.: 219—234.
- Cappelletti, C., 1942:* Colture di tessuti vegetali. II. Recherche sul contenuto idrico delle colture di *Daucus Carota* Att. Ac. Sc. Torino, 77.:293—321.
- Cappelletti, C., 1947:* Colture di tessuti vegetali. IV. Ricerche nelle variazioni del contenuto d'acque nelle colture di *Daucus carota*. Att. Ac. Sc. Torino, 82.: 134—143.
- Gautheret, R. J., 1959:* La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation. Paris. Masson and Cie.
- Goris, A., 1947:* Hydratation de fragments de tubercules de Carotte et de Topinambour cultivés in vitro sur milieux dépourvus de sucres: influence de l'acide indole-3-acétique. *C. R. Soc. Biol.* 141.: 1205—1207.
- Hackett, D. P. and Thimann, K. V., 1952:* The effect of auxin on growth and respiration of artichoke tissue. *Proc. Nat. Ac. Sc.* 38.: 770—775.
- Heller, R., 1949:* Sur l'emploi de papier filtre sans cendres comme support pour les cultures de tissus végétaux *C. R. Soc. Biol.* 143.: 353—357.

- Heller, R.*, 1951: Sur l'action physique favorable exercée sur la croissance des cultures de tissus végétaux par le contact d'un milieu gélosé ou d'un gel de silice. *C. R. Soc. Biol.* 145, : 675—677.
- Heller, R.*, 1953: Recherches sur la nutrition minérale de tissus végétaux cultivés in vitro. Thèse, Paris, 225 p. et *Ann. Sc. Nat. Bot. Vég.* 14, : 1—223.
- Jelaska, S.*, 1965: Studije rasta tkiva kotiledona vrste *Cucurbita pepo* L. uzgajanog in vitro. Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1—79.
- Muir, W. H., Hildebrandt, A. C. and Riker, A. J.*, 1958: The preparation, isolation and growth in culture of single cells from higher plants. *Amer. Jour. Bot.* 43, : 839—851.
- Nitsch, J. P. and Nitsch, C.*, 1956: Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissue. I. *Amer. Jour. Bot.* 43, : 839—851.
- Reinders, D. E.*, 1942: Intake of water by parenchymatic tissue. *Rec. Trav. Bot. Néerl.* 39, : 1—140.
- Wetmore, R. H. and Rier, J. P.*, 1963: Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. *Amer. Jour. Bot.* 50, : 418—430.
- White, Ph. R.*, 1953: A comparison of certain procedures for the maintenance of plant tissue cultures. *Amer. Jour. Bot.* 40, : 517—524.

SUMMARY

THE EFFECT OF AGAR CONCENTRATION ON THE GROWTH OF COTYLEDON TISSUE OF PUMPKIN IN VITRO

Sibila Jelaska

(Department of Plant Physiology, Botanical Institute of the University Zagreb)

Tissue fragments of cotyledons of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) were cultivated on Heller's nutrient medium — in artificial light (485 ± 45 lux) as well as in darkness — and the effect of the agar concentration (0%, 0,5%, 1%, and 1,3%) on their growth rate was investigated.

Both in light and darkness the highest increase of fresh and dry weight of the tissue fragments has been obtained with 0,5% agar concentration, the growth rate being in light always much bigger than in darkness.