

## UTJECAJ 2,4-D I 2-NOXA NA POVEĆANJE BROJA STANICA EKSPLOANTATA BUNDEVE

With Summary in English

**SIBILA JELASKA**

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

Primljeno 15. 1. 1970.

### Uvod

Rast neke kulture tkiva je rezultat procesa dijeljenja i rasta stanica. Za njegovu procjenu služimo se u praksi raznim testovima, kao npr. određivanjem prirasta svježe i suhe težine, određivanjem povećanja površine, određivanjem dušika, histološkim istraživanjima, metodom brojanja stanica na početku i kraju kulture (Steward i Shantz, 1955). Ova zadnja operacija je duga i teška u tolikoj mjeri da se u praksi služimo uglavnom naprijed navedenim testovima.

Usprkos teškoćama u ovom slučaju ipak se želilo tom metodom utvrditi djelovanje 2,4-D i 2-NOXA na fragmente tkiva kotiledona uzgajanih in vitro.

### Materijal i metode

Za svoje eksperimente upotrijebili smo bundevu (*Cucurbita pepo* L., varijetet nepoznat). Probrano sjeme bilo je sterilizirano otopinom kalcijeva hipoklorita (3,5 %) dva sata uz stalno miješanje magnetskom mješalicom. Sjemenke, oslobođene teste, stavljene su sterilno klijeti u tamu na temperaturi od 27°C. Nakon 4 dana od iskljalih biljaka uzeli smo za eksperimente diskove tkiva kotiledona promjera 9 mm. Diskovi su bili uronjeni u medij, jedanput proksimalnom stranom, drugi puta distalnom.

Osnovni medij bio je po Helleru (1953) uz dodatak 3 % glukoze, 10<sup>-8</sup> aneurina i 0,8 % bacto agara Difco. Prije autoklaviranja pH medija bio je 5,6.

Toj podlozi su onda dodane tvari rastenja: 2,4-D (2,4-diklorofenoksi-octena kiselina) i 2-NOXA (2-naftoksiocetena kiselina) u nizu koncentracija od  $10^{-9}$  —  $10^{-5}$ .

Upotrebijene su bile epruvete veličine  $23 \times 200$  mm a punjene su bile s 25 ml medija. Medij je autoklaviran 20 min. kod temp. od  $120^{\circ}\text{C}$  i 1,5 Atm. U svaku epruvetu bio je nasaden samo jedan eksplantat. Kulture su držane u termostatu u mraku na temperaturi od  $26^{\circ}\text{C}$ . Trajanje pokusa iznosilo je 25 dana. Svaki pokus bio je rađen s najmanje 10 epruveta.

Kao što je u uvodu rečeno, procjena intenziteta proliferacije diskova vršena je brojanjem stanica na početku i kraju kulture. Početno brojanje bilo je izvršeno na uzorku, koji je bio što je moguće sličniji fragmentima koji su bili stavljeni u kulturu.

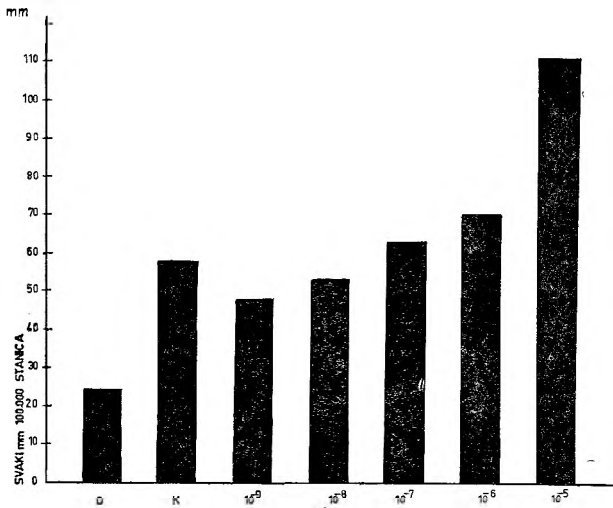
Priprema tkiva za brojanje stanica. Tkivo, kojem se želio utvrditi broj stanica, stavilo se preko noći u 10 ml mješavine 5%-tne kromne kiseline i 5%-tne solne kiseline. Na taj način eksplantat je bio maceriran i pretvoren u kašu. Da bi se disociiranje tkiva što bolje izvršilo, ta se kaša pomoću injekcione štrcaljke nekoliko puta provukla kroz injekcionu iglu promjera oko 1 mm, kako bi se stanice odvojile jedna od druge prilikom prolaska kroz kanal igle. Na kraju se igla još isprala s 2 ml vode. Tako smo dobili ukupno 12 ml kašaste suspenzije.

Brojanje stanica izvršilo se na slijedeći način. Suspenzija se dobro izmiješala radi što bolje homogenosti. Od nje se uzelo pipetom par kapi i stavilo u komoricu za brojanje stanica po Fusch-Rosentalu (specijalizirana komorica hematocitometra). Ova komorica ima urezanu mrežicu od šest velikih kvadrata, od kojih je svaki razdijeljen na šesnaest malih. Visina stupca tekućine iznosila je kod komorice pokrivene pokrovnicom 0,2 mm. Površina malog kvadrata ima  $1/16$ -tinu  $\text{mm}^2$ . Prema tome volumen malog kvadrata iznosio je  $1/80$ -tinu  $\text{mm}^3$  tj. 0,0125 ml. Za određivanje srednje vrijednosti kod svakog eksplantata brojilo se osamdeset malih kvadrata. Nakon toga izračunala se prosječna vrijednost broja stanica. Ova se pomnožila brojem 80, te se dobio broj stanica u  $1 \text{ mm}^3$ , a iz ove vrijednosti lako se onda izračunao broj stanica u 12 ml suspenzije, tj. broj stanica čitavog eksplantata.

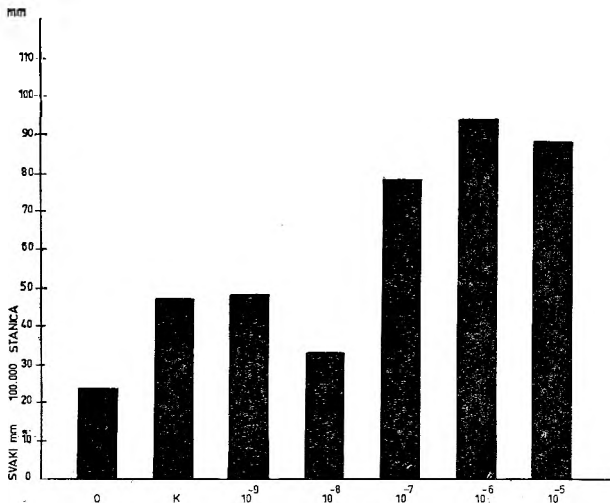
### Pregled rezultata

Eksplantati koji su bili upotrebijeni bili su što je moguće uniformniji. Njihova težina prije stavljanja u epruvete s medijem iznosila je 80 mg. Nakon 25 dana kulture su bile podvrgnute već navedenom postupku. Za usporedbu izvršeno je mjerenje i s početnim eksplantatom (0) i s kontrolom (K). Dobiveni podaci prikazani su u grafikonima pomoću jednostavnih stupaca, gdje svaki mm znači 100.000 stanica. Iz grafikona (sl. 1—4) je vidljivo da je broj stanica veći kod eksplantata koji su bili uzgajani na mediju kojemu su bile dodane 2,4-D i 2-NOXA u koncentracijama od  $10^{-7}$  —  $10^{-5}$ .

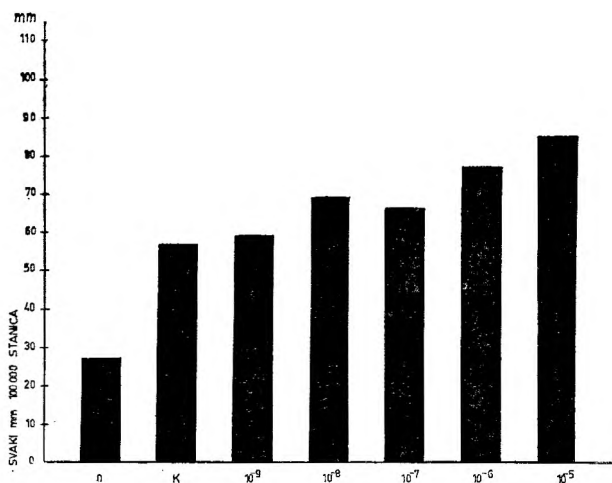
Tako dobiveni rezultati nisu bili statistički obrađeni, no oni usprkos tome pokazuju da stvarno postoji prirast broja stanica u ovisnosti o 2,4-D i 2-NOXA, naročito kod koncentracija  $10^{-7}$  —  $10^{-5}$ . To se slaže s rezultatima histoloških zapažanja (J e l a s k a 1966) i s rezultatima određivanja prirasta svježe i suhe tvari, koji je mjeren na tkivima (J e l a s k a, neobjavljeno). Što je bila jača koncentracija to je tkivo aktivnije reagiralo i imalo veći broj stanica.



Sl. 1. Djelovanje niza koncentracija 2,4-D na povećanje broja stanica kod eksplantata orijentiranih proksimalnom stranom u medij.  
 Fig. 1. The effect of the concentrations of 2,4-D on the increase of the number of cells in explants placed with their proximal part on the medium.

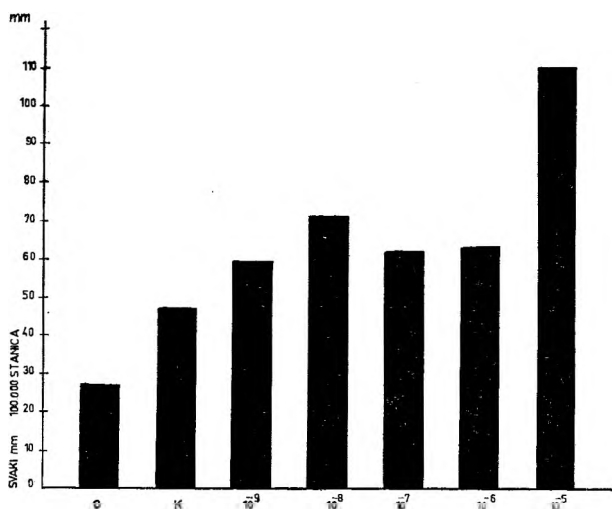


Sl. 2. Djelovanje niza koncentracija 2,4-D na povećanje broja stanica kod eksplantata orijentiranih proksimalnom stranom izvan medija.  
 Fig. 2. The effect of the concentrations of 2,4-D on the increase of the number of cells in explants placed with their proximal part outside of the medium.



Sl. 3. Djelovanje niza koncentracija 2-NOXA na povećanje broja stanica kod eksplantata orijentiranih proksimalnom stranom u mediju.

Fig. 3. The effect of the concentrations of 2-NOXA on the increase of the number of cells in explants placed with their proximal part on the medium.



Sl. 4. Djelovanje niza koncentracija 2-NOXA na povećanje broja stanica kod eksplantata orijentiranih proksimalnom stranom izvan medija.

Fig. 4. The effect of the concentrations of 2-NOXA on the increase of the number of cells in explants placed with their proximal part outside of the medium.

## Zaključak

Nakon 25 dana kultiviranja fragmenata tkiva kotiledona bundeve na mediju kojemu su bili dodani 2,4-D ili 2-NOXA u nizu koncentracija od  $10^{-9}$  do  $10^{-5}$  pristupilo se brojanju stanica.

Utvrđilo se da je broj stanica veći kod fragmenata koji su bili uzgajani na mediju s navedenim supstancijama u koncentracijama  $10^{-7}$ — $10^{-5}$  prema kontroli ili prema eksplantatu koji nije bio kultiviran. To potvrđuje da ovi stimulatori rasta u većim koncentracijama stvarno utječu na diobu stanica tkiva kotiledona bundeve.

Toplo zahvaljujem prof. dru Zvonimiru Devidću na savjetima i pomoći koje mi je pružio u toku rada.

## Literatura — References

- 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., 1966: Djelovanje 2-naftoksiotene kiseline i 2,4-diklorofenoksiotene kiseline na fragmente tkiva kotiledona bundeve (*Cucurbita pepo* L.) uzgajane in vitro. Acta Bot. Croat. 25, 121—135.
- Steward, F. C., and Shantz, E. M., 1955: The chemical induction of growth in plant tissue cultures. The chemistry and mode of action of plant growth substances. Proc. Symp. Wye College, 165—186.

## SUMMARY

### THE EFFECT OF 2,4-D AND 2-NOXA ON THE INCREASE OF THE NUMBER OF CELLS IN EXPLANTS OF PUMPKIN

*Sibila Jelaska*

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

By the method of Steward and Shantz (1955) it has been attempted to determine the effect of 2,4-D and 2-NOXA (conc.  $10^{-9}$  —  $10^{-5}$ ) on the increase of the number of cells in explants of pumpkin. The cells were counted at the beginning of the experiments on a sample (0), which was very similar to the explants under treatment and at the end of the experiments which lasted 25 days. For comparison countings on explants cultivated on the medium without addition of growth-stimulators were used.

The results obtained are shown in graphs by means of simple columns, 1 mm column height corresponding to 100,000 cells. It is evident that the cell number of explants, which grew on a medium with 2,4-D and 2-NOXA at higher concentrations ( $10^{-7}$  —  $10^{-5}$ ) was larger in comparison to the control as well as to the explants grown at lower concentrations of the substances investigated.

Sibila Jelaska, mr biol.  
Odjel za fiziologiju bilja  
Institut za botaniku  
Sveučilišta u Zagrebu  
Rooseveltova trg 6/III  
Zagreb (Jugoslavija)