

# RASTENJE FRAGMENTATA ZRELOG EMBRIJA BUNDEVE UZGAJANIH IN VITRO

With Summary in English

SIBILA JELASKA

(Institut za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno 24. 1. 1973.

## Uvod

Kulturu embrija zamislio je Hannig (1904). Metodu je postepeno usavršio niz autora, a definitivno su je razradili van Overbeek, Conklin i Blakeslee (1942). Ona je pokazala da mlade biljčice iz sjemenaka, koje još nisu postigle zrelost, imaju svojstvo vrlo bujnog rastinja. Tu činjenicu potvrdili su Lee (1950) i Morel (1956) upotrijeбивши mlade klice iz sjemenaka duda. U kulturu su stavljali fragmente kotiledona, hipokotila ili plumulu. Ovakvo embrionsko tkivo proliferiralo je vrlo često mnogo intenzivnije od tkiva starih biljaka. Zahvaljujući ovoj tehnici Morel (1956) dobio je loze tkiva vrste *Pinus strobus*, *Lilium Formosanum* i hibrida roda *Iris*, za razliku od drugih tehnika koje su davale osrednje rezultate.

La Rue (1947) i njegovi učenici Lampton (1953) te Straus (1954) uzgajali su loze tkiva posluživši se mladim endospermom kukuruza i vrste *Asimina triloba* kao izvornim materijalom. Norstog (1955) je kultivirao tkivo endosperma raznih trava. G. 1956. Morel preporučuje ovu tehniku za dobivanje loze tkiva onih biljaka, kod kojih primjena klasične tehnike dovodi samo do ograničenog rasta. Embrio dikotiledona sastoji se od osi korijen — hipokotil koja završava svoj gornji dio meristemom epikotila, a donji meristemom korijena. Kotiledoni inseriraju na ovoj osi na bazi meristema epikotila. Najdiferenciraniji su sami kotiledoni koji imaju u pravilu ograničenu sposobnost proliferacije. Molliard (1921) je pokazao da se izolirani kotiledoni rotkvice, kultivirani na hranjivom mediju, razvijaju mnogo jače nego oni koji su ostali na nedirnutim biljkama. Lee (1950) je naišao na isti fenomen kod rajčice,

no preživljavanje je bilo ograničeno. Nasuprot tome Morel je ustanovio da se dovoljno debeli fragment kotiledona, ako se stavi u kulturu (npr. kod vrste *Persea gratissima*) brzo razvija, stvarajući kod toga nediferencirani kalus. Ako se razmatra mogućnost proliferacije drugih dijelova embrija može se prikazati primjer vrste *Lupinus Hartwegii*. Kotiledoni su bili odijeljeni od osi epikotil — korijen, a os podijeljena na tri dijela, koji su bili pojedinačno zasađeni na hranidbenu podlogu. Gornji dijelovi, koji su obuhvaćali epikotil s njegovim apikalnim meristemom, razvijali su se normalno i formirali lisnatu stabljiku koja je stvarala korijenje. Iz toga razvila se normalna biljčica. Dio korjenčića izrastao je u normalan korijen. Međufragment, lišen korelacije dvaju meristema, stvara kalus nediferenciranog parenhima koji tako postaje polazna točka kulture tkiva s.s., sposobnog za sukcesivno razmnažanje. (Lee, 1955 a).

Analogne rezultate postigao je na vrsti *Lupinus albus* Ball (1946). Monografske prikaze kulture biljnog embrija dali su Rappaport (1954) te Narayanaswami i Norstog (1964) pa nije potrebno ovdje iznositi dobivene rezultate.

## Materijal i metode

Istraživanja su vršena na tkivu bundeve (*Cucurbita pepo* L.) različitog porijekla sjemena. Osnovna tehnika, koju sam koristila u toku ovih istraživanja, bila je kultura biljnog tkiva koju je opširno i detaljno opisao Gautheret (1942 i 1959).

Kod istraživanja eksplantata zrelog embrija, sjemenke sam nakon sterilizacije kalcijevim hipokloritom i skidanja teste ostavila bubrati u vodi 24 sata. Nakon toga sam pod binokularnom lupom pomoću žileta odvajala kotiledone od embrija, a same embrije rezala na 0,5—0,75 mm velike fragmente, koje sam označavala kao A-segment (vršak embrija) i B-segment (dio hipokotila ispod A-segmenta, lišen utjecaja meristemskog vrška).

Hranidbeni mediji, koje sam najčešće koristila u ovim pokusima bili su: Hellerov medij (Heller 1953), MS-medij (Murashige i Skoog 1962), Robbinsov (Ball 1946) i nešto modificirani Whiteov medij (White 1943). Ovim osnovnim podlogama, bez obzira koja je bila upotrebljena, dodavala sam uvijek Bacto-agar Difco u koncentraciji od 0,5—0,8% i ugljikohidrate (saharozu 2% ili glukozu 3%). Stimulatori rasta, koje sam dodavala podlogama i upotrebljavala u svojim istraživanjima, bili su: indolil-3-octena kiselina, 2,4-diklorofenoksiocetena kiselina, 2,4,5-triklorofenoksiocetena kiselina, kinetin (6-furfurilaminopurin), adenin-CHR (prirodni), kokosovo mlijeko i ekstrakt kvasca Difco. Prije autoklaviranja pH medija bio je 5,5—5,6. Za kulture su bile korištene epruvete veličine  $23 \times 200$  mm i punjene s 25 ml medija. Medij je bio autoklaviran 20 min kod temperature od 120 °C i 1,5 Atm. Epruvete su nakon inokuliranja bile zatvorene čepovima od hidrofilne vate i aluminijskom folijom.

Eksperimenti su trajali najmanje po mjesec dana. U svaku epruvetu bio je nasađen samo jedan eksplantat. Segmenti su bili sađeni korijenskom (proksimalnom) stranom u medij. Kulture su bile držane u mraku u termostatu na temperaturi od 26 °C. Svaki eksperiment urađen je bio s najmanje 20 eksplantata.

Tumač kratica: indolil-3-octena kiselina — IAA; 2,4-diklorofenoksi-octena kiselina — 2,4-D; 2,4,5-triklorofenoksiocetena kiselina — 2,4,5-T; kinetin — k; kokosovo mlijeko — C.M.; ekstrakt kvasca — y. e.; Murasnige-Skoogov medij — MS-medij; mješavina vitamina u Robbinsovom mediju — D; Robbinsov osnovni medij kao kontrola — K.

## Eksperimentalni dio

### 1. Najpogodniji osnovni medij

Kao osnovne medije uzela sam otopine makroelemenata i mikroelemenata koje preporučuju Heller (1953), Robbins (Ball 1946), White (1943) i Murashige i Skoog (1962).

Eksplantati bili su zasađeni jednom na površinu medija, a drugi puta submeržno. Konačna srednja vrijednost svježe i suhe tvari svih eksplantata zasađenih površinski bila je uvijek veća od istih zasađenih submeržno. Dobiveni rezultati su prikazani u tabelama 1, 2, 3 i 4.

Tabela 1. Srednja vrijednost konačne svježe tvari A-segmenta (u mg):

Medij	Površinski sađeni segmenti	Submeržno sađeni segmenti
Robbinsov	50,4 ± 9,0	19,8 ± 3,8
Hellerov	74,9 ± 2,0	28,0 ± 5,0
Whiteov	54,9 ± 9,5	29,8 ± 4,5

Tabela 2. Srednja vrijednost konačne suhe tvari A-segmenta (u mg):

Medij	Površinski sađeni segmenti	Submeržno sađeni segmenti
Robbinsov	3,2 ± 0,3	1,7 ± 0,2
Hellerov	4,6 ± 0,4	3,2 ± 0,1
Whiteov	3,7 ± 0,2	2,8 ± 0,3

Tabela 3. Srednja vrijednost konačne svježe tvari B-segmenta (u mg):

Medij	Površinski sađeni segmenti	Submeržno sađeni segmenti
Robbinsov	27,7 ± 5,9	17,7 ± 3,1
Hellerov	44,3 ± 6,5	22,2 ± 2,2
Whiteov	29,5 ± 5,4	22,5 ± 3,1

Tabela 4. Srednja vrijednost konačne suhe tvari B-segmenta (u mg):

Medij	Površinski sađeni segmenti	Submerzno sađeni segmenti
Robbinsov	2,0 ± 0,4	0,9 ± 0,2
Hellerov	3,1 ± 0,5	2,7 ± 0,1
Whiteov	2,5 ± 0,4	1,9 ± 0,2

Najbolji prirast svježe i suhe tvari eksplantata bio je dobiven na Hellerovom osnovnom mediju, bilo da su oni bili zasijani površinski bilo submerzno.

A-segment zasijan površinski razvio je hipokotil (sl. 1.) koji je bio, ovisno o mediju, bolje ili slabije razvijen, te neznatno i slabo korijenje, kratko i nerazgranato. Submerzno zasadeni A-segmenti nisu izdiferencirali organe (sl. 1.), već su ostali u obliku grudice tkiva. B-segment zasijan površinski razvio se u kratki segment hipokotila (sl. 2.) na čijem su se proksimalnom dijelu razvili korjenčići, bolje razvijeni i jači od onih razvijenih na A-segmentu. I ovi eksplantati uzgajani submerzno, nisu pokazivali nikakvu diferencijaciju (sl. 2, donji niz). Na temelju ovih pokusa pokazao se Hellerov medij od ispitanih najpogodnijim, te sam ga u daljnjim pokusima pretežno upotrebljavala uz dodatak šećera i agara.

## 2. Djelovanje stimulativnih supstancija u Robbinsovom osnovnom mediju

Medij je sadržavao makroelemente prema Robbinsovim navodima, mikroelemente prema Berthelotovim navodima, 2% saharoze i 0,8% agara. Ovom osnovnom mediju bile su onda dodane ove dodatne (D)

Tabela 5. Rast A-segmenta zrelog embrija u ovisnosti o hranidbenom mediju. Robbinsov osnovni medij

Medij	Nakon 10 dana			Nakon 21 dan		
	% kultura hipokotil	% kultura korijen	% kultura kalus	% kultura hipokotil	% kultura korijen	% kultura kalus
K	100	100	0	100	100	0
K + D	87,5	75	12	100	100	12
K + D + C.M.	100	100	0	100	100	20
K + D + C.M. + y.e.	100	77,5	0	100	100	0
K + D + C.M. + 10 <sup>-6</sup> 2,4-D	11	11	100	11	22	100
K + 10 <sup>-5</sup> k	22	22	100	22	33	100
K + D + 10 <sup>-6</sup> IAA + 10 <sup>-6</sup> k	0	20	100	40	40	100

Tabela 6. Rast B-segmenta zrelog embrija u ovisnosti o hranidbenom mediju. Robbinsov osnovni medij

Medij	Nakon 10 dana			Nakon 21 dan		
	% kultura hipo-kotil	% kultura korijen kalus		% kultura hipo-kotil	% kultura korijen kalus	
K	88,5	77,5	11	88,5	88,5	11
K + D	33	22	100	33	33	100
K + D + C.M.	100	100	44	100	100	44
K + D + C.M. + y.e.	100	100	0	100	100	0
K + D + C.M. + $10^{-6}$ 2,4-D	0	12,5	100	0	12,5	100
K + $10^{-5}$ k	30	40	20	30	40	20
K + D + $10^{-6}$ IAA + $10^{-6}$ k	0	50	100	0	50	100

Tabela 7. Postotak kultura s induciranim kalusom u ovisnosti o sastavu medija i intenzitet kalusnog rasta. Robbinsov osnovni medij. Kulture stare 21 dan.

Medij	A-segment		B-segment	
	% kultura	intenzitet rasta	% kultura	intenzitet rasta
K	0	0	11	+
K + D	12,5	+	100	++
K + D + C.M.	0	0	44	+
K + D + C.M. + y.e.	0	0	0	0
K + D + C.M. + $10^{-6}$ 2,4-D	100	++++	100	++
K + $10^{-5}$ k	100	+++	20	+++
K + D + $10^{-6}$ IAA + $10^{-6}$ k	100	+++	100	++++

Oznake intenziteta rasta: djelomična kalogeneza +  
 općenita, no neznatna kalogeneza ++  
 dobra proliferacija +++  
 vrlo dobra proliferacija ++++

supstancije u mg/l: aneurin-HCl 0,15; askorbinska kiselina 20; nikotinska kiselina 0,5; piridoksin-HCl 0,2; jantarna kiselina 25; riboflavin 0,1; Ca-pantotenat 0,5; p-aminobenzojeva kiselina 0,2; inositol 0,2; i biotin 4 gamma. Tu grupu supstancija dodavala sam uvijek zajedno. Koristila sam još i autoklavirano C. M. 9% (vol.), kinetin u koncentraciji  $10^{-6}$  i  $10^{-5}$ , IAA u koncentraciji  $10^{-6}$ , 2,4-D u koncentraciji  $10^{-6}$  i 0,5% ekstrakta kvasca (Difco). Te su supstancije bile dodavane pojedinačno ili u kombinacijama. Askorbinska kiselina bila je sterilizirana eterom

i dodana u medij nakon autoklaviranja. Svaka epruveta sadržavala je 10 ml medija. Bili su istraženi slijedeći mediji: Robbinsov osnovni medij kao kontrola (K), K + D, K + D + C. M., K + D + C. M. + 0,5% y. e., K + D + C. M. +  $10^{-6}$  2,4-D, K +  $10^{-5}$  k i K + D +  $10^{-6}$  IAA +  $10^{-6}$  k.

Eksplantati su na ovakvim različito sastavljenim hranidbenim podlogama stvarali djelomično organe ili nediferencirani kalus. U tabeli 5 prikazani su dobiveni rezultati na A-segmentima, a u tabeli 6 rezultati dobiveni na B-segmentima. Tabela 7 prikazuje postotak kultura, koje su stvarale kalus i intenzitet njegovog rasta.

### 3. Djelovanje stimulativnih supstancija u Hellerovom mediju

Ispitala sam djelovanje IAA, 2,4-D, 2,4,5-T, kinetina i adenina-CHR u nizu koncentracija dodanih osnovnom mediju po Helleru.

#### a) Djelovanje IAA (sl. 3)

Istraženo je djelovanje IAA u koncentracijama od  $10^{-7}$  do  $10^{-5}$ . U koncentraciji od  $10^{-7}$  IAA nije omogućila ujednačeni razvitak hipokotila kod A-segmenta. Razvili su se ili kratki odebljali ili tanki i produženi odsječci hipokotila. Dodatak IAA povećao je broj induciranog korijenja koje je ipak ostalo kratko i nerazgranjeno. Na jednom dijelu primjeraka B-segmenata induciralno se korijenje također na distalnoj strani. Koncentracija  $10^{-6}$  pogodovala je razvitku hipokotila (A-segment) koji se razvio jače i deblje od onog u kontroli te bio znatno duži. Razvilo se mnogo više korijenja, no svi su oni bili vrlo kratki i zakočeni u rastu. Koncentracija  $10^{-5}$  je izazivala zadebljanje hipokotila i gubitak polarnosti pojave korijenja, jer se ono razvilo i na distalnoj strani. Korjenčići inducirani na distalnoj strani u odnosu na one s proksimalne bili su dvostruko dulji i tanji.

#### b) Djelovanje 2,4-D

Istraženo je djelovanje 2,4-D u koncentracijama od  $10^{-8}$  do  $10^{-5}$ . U ovisnosti o različitim koncentracijama ove supstancije reakcija A-segmenta (sl. 4) bila je ova:

Kod koncentracije  $10^{-8}$  eksplantati su reagirali kao u kontroli, tek su korjenčići bili nešto jače razvijeni. Razvoj hipokotila bio je zakočen kod koncentracije  $10^{-7}$ , a bilo je još induciranog korijenja. Kod koncentracije  $10^{-6}$  bio je potpuno zakočen razvoj hipokotila. Razvile su se samo grudice nediferenciranog tkiva i vrlo tanki i rijetki korjenčići. Kod  $10^{-5}$  dobila sam još samo grudice nediferenciranog tkiva bez vidljivog korijenja. Tkivo je poprimilo proziran, staklast izgled, stanice su bile disociirane, tzv. »embrijskog« tipa. Slično je reagirao i B-segment (sl. 5). Kod koncentracije  $10^{-8}$  segmenti su se razvijali kao u kontroli (sl. 6a). Koncentracija  $10^{-7}$  uzrokovala je zadebljanje hipokotila i smanjenje broja korijenja u odnosu na prethodnu koncentraciju (sl. 6b). Kod visokih koncentracija  $10^{-6}$  i  $10^{-5}$  B-segment je reagirao jednako kao i A-segment (sl. 6c i 6d).

#### c) Djelovanje 2,4,5-T

Istraženo je djelovanje u koncentracijama od  $10^{-7}$  do  $10^{-5}$ . Reakcija A-segmenta na porast koncentracije 2,4,5-T bila je ova: Koncentracija  $10^{-7}$  zakočila je normalan razvitak hipokotila i korijenja. Razvio se abnormalni hipokotil s kalusom na proksimalnoj strani, koja je bila uronjena u medij. Kod koncentracije  $10^{-6}$  bila je još jače iskazana odsutnost bilo kakve organogeneze pa se ni kalus nije značajnije razvio. Kod koncentracije  $10^{-5}$  eksplantati su ostali mali u vidu malih grudica nediferenciranog tkiva (sl. 7). Reakcija B-segmenta bila je slična (sl. 8). Kod  $10^{-7}$  eksplantati su još imali korjenčiće, iako mnogo manje nego u kontroli. Kod  $10^{-6}$  nema više ni jednog korjenčića. Kod koncentracije  $10^{-5}$  eksplantati su bili neznatne veličine u vidu malih grudica nediferenciranog tkiva.

#### d) Djelovanje kinetina

Djelovanje kinetina ispitano je u koncentracijama od  $10^{-8}$  do  $10^{-5}$ . Reakcija A-segmenta (sl. 9) bila je ova: Kod koncentracije  $10^{-8}$  hipokotil se razvijao kao kod kontrole, dok je korijenje bilo kratko i malobrojno. Kod koncentracije  $10^{-7}$  hipokotil se nešto skratio u usporedbi s onima kod  $10^{-8}$  i često se razvijao zakržljali epikotil. Kod koncentracije  $10^{-6}$  bio je hipokotil sasvim kratak, rast korijena zakočen, no razvile su se kalusne nakupine. Kod koncentracije  $10^{-5}$  eksplantati su ostali vrlo maleni, u vidu grudica, razvitak korijenja je bio potpuno zakočen, a nazirao se vršak epikotila. B-segment ponašao se kod istih koncentracija analogno A-segmentu. (sl. 10).

#### e) Djelovanje adenina-CHR

Istraženo je djelovanje adenina u koncentracijama od  $10^{-7}$  do  $10^{-5}$ . Eksplantati su kod sve tri koncentracije adenina reagirali potpuno jednako kao kod kontrole. Kod koncentracije  $10^{-7}$  hipokotil je pokazivao uvijanje i bio nešto slabiji od onih koji su se razvijali na koncentracijama  $10^{-6}$  i  $10^{-5}$ . Razvitak korijena bio je isti kao i kod kontrole.

#### f) Zajedničko djelovanje kinetina i IAA

Pod zajedničkim djelovanjem IAA i kinetina (obje supstance u koncentraciji  $10^{-6}$ ) A-segment se nepravilno razvijao bez diferencijacije hipokotila i s neznatnim brojem slabih korjenčića. Nije bio vidljiv ni neki značajniji razvitak kalusa, koji je također bio zakočen u rastu. B-segment reagirao je slično kao na mediju, kome je bila dodana sama IAA u koncentraciji  $10^{-6}$ .

### 4. Djelovanje MS-medija

Na MS-mediju (kompletnom), uz dodatak 3% glukoze i 1% agara, uzgajala sam A-segmente na dnevnoj svjetlosti u sobnim uvjetima. Segmenti su dobro rasli. Razvijali su snažnu stabljiku s normalnim listićima tamnozeleno boje i jakim korijenskim sistemom. U ovim uvjetima A-segment bio je u mogućnosti da se dalje razvije u normalnu biljku, dok to na Hellerovom osnovnom mediju nije bio slučaj.

## Osvrt na rezultate i diskusija

Razumljivo je da rast embrija ili njegovih segmenata uzgajanih u kulturi ovisi, osim o mogućnosti samog tkiva, također i o sastavu medija. Osnovni faktor u naknadnom rastu takvih segmenata jeste produžni rast embrijskog tkiva ili embrija. Da li će ovaj biti jači ili slabiji, ili će biti zakočen, ovisit će mnogo o supstancama u hranidbenoj podlozi. Sanders (1950) je iznio podatke o efektu različitih koncentracija saharoze,  $\text{Na}(\text{PO}_3)_n$  i filtriranog ekstrakta ječma u mediju. Maheshwari i Ranga Swamy (1958) ustanovili su da razvitku embrija vrste *Citrus microcarpa* pogoduju tama i ekstrakt kvasca. Ball (1946) i Lee (1955a, b) utvrdili su svojim eksperimentima da samo A-segment ima sposobnost regenerirati čitavu biljku, dok ostali segmenti, osim pokazivanja ograničenog produžnog rasta, to nisu u mogućnosti. To bi značilo da kapacitet rasta i razvitka jako opada udaljenošću od vrška. Sen i Verma (1957) su također dobili regeneraciju kompletne biljke od apikalnog meristema hipokotila vernaliziranog sjemena gorušice rastućeg u uvjetima in vitro, a Furuya (1956) i Furuya i Soma (1957) opisali su direktan efekt različitih auksina na razvitak nedirnutih embrija graha, dekontiliziranih embrija kao i odrezanih fragmenata. Zenkteler i suradnici (1961) postigli su najbolji rast embrija mrkve na Whiteovom mediju s dodatkom 15% kokosovog mlijeka. Raghavan i Torrey (1963) iznose da proembrio vrste *Capsella bursa pastoris* može rasti na mediju kome su dodani IAA, kinetin i adenin u zajedničkoj kombinaciji, no da ne raste na mediju, ako su ove supstance bile dodavane pojedinačno.

---

Tabla I — Plate I.

- Sl. 1. A-segment uzgajan na Whiteovom osnovnom mediju.  
Gornji niz: segmenti zasađeni površinski.  
Donji niz: segmenti zasađeni submeržno.
- Fig. 1. Segment A cultivated on White's basal medium  
Upper row: segments planted on the surface of the medium  
Lower row: segments submerged.
- Sl. 2. B-segment uzgajan na Whiteovom osnovnom mediju.  
Gornji niz: segmenti zasađeni površinski.  
Donji niz: segmenti zasađeni submeržno.
- Fig. 2. Segment B cultivated on White's basal medium  
Upper row: planted on the surface  
Lower row: submerged

Tabla II — Plate II.

- Sl. 3. Djelovanje IAA na segmente A (gornji niz) i B (donji niz) 3a — c. Djelovanje IAA u koncentracijama: a)  $10^{-7}$ , b)  $10^{-6}$ , c)  $10^{-5}$ . Osnovni Hellerov medij.
- Fig. 3. The effect of IAA on segments A (upper row) and B (lower row).  
3a — c. The effect of IAA in concentration a)  $10^{-7}$ , b)  $10^{-6}$ , c)  $10^{-5}$ . Heller's basic medium.



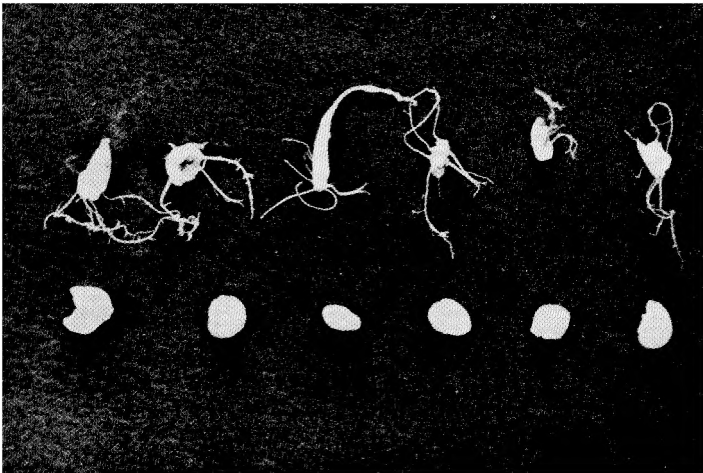
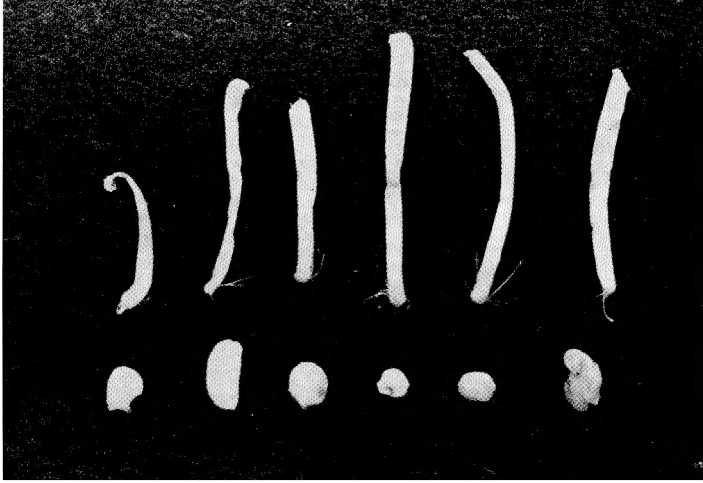


Tabla I. — Plate I.

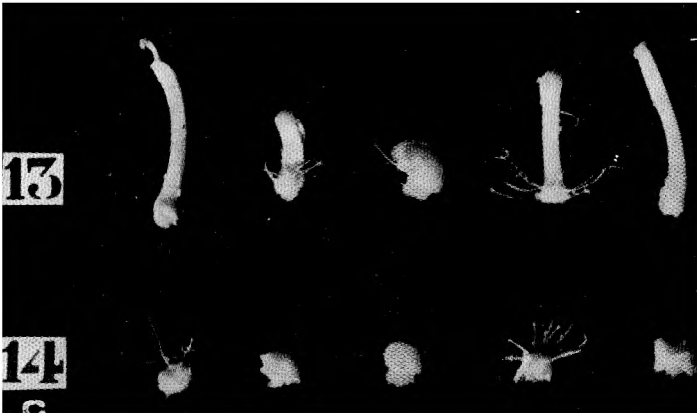
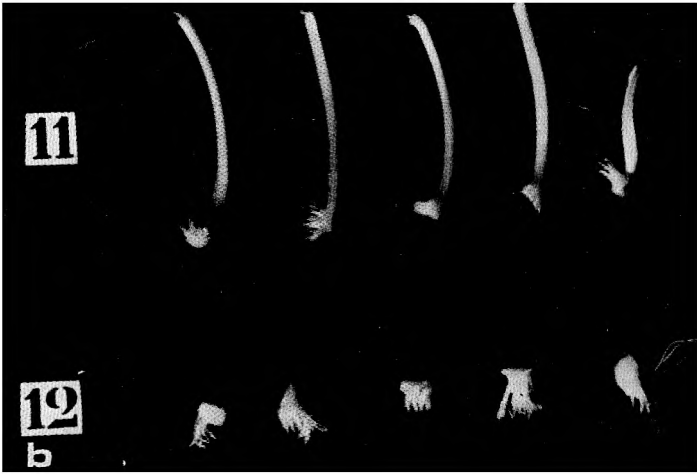


Tabla II. — Plate II.

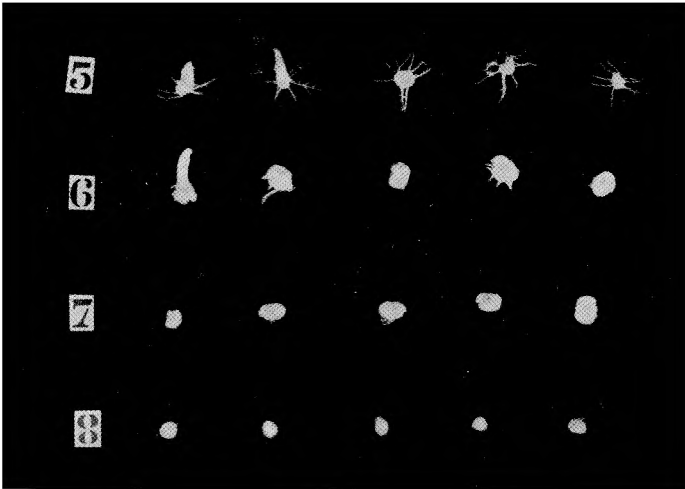
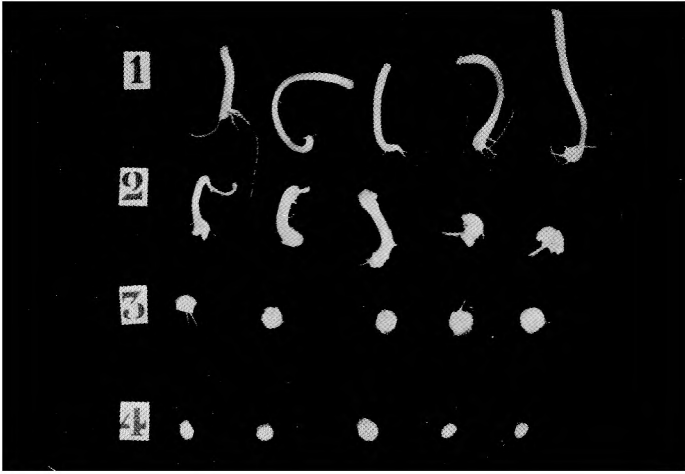


Tabla III. — Plate III.

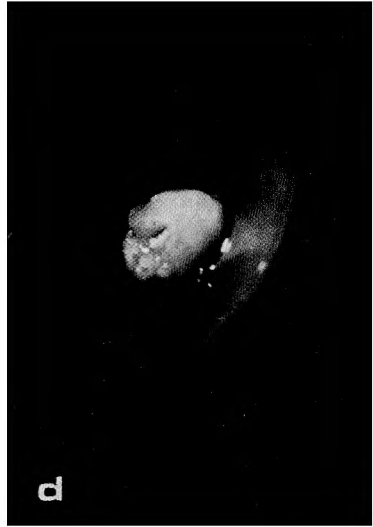
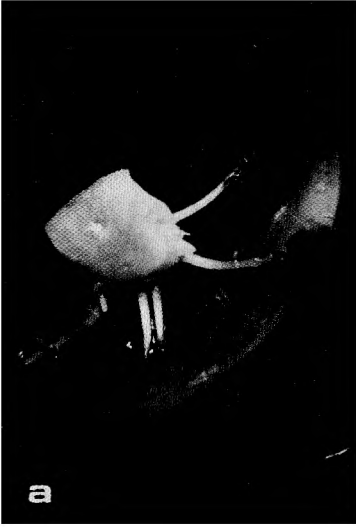


Tabla IV. — Plate IV.

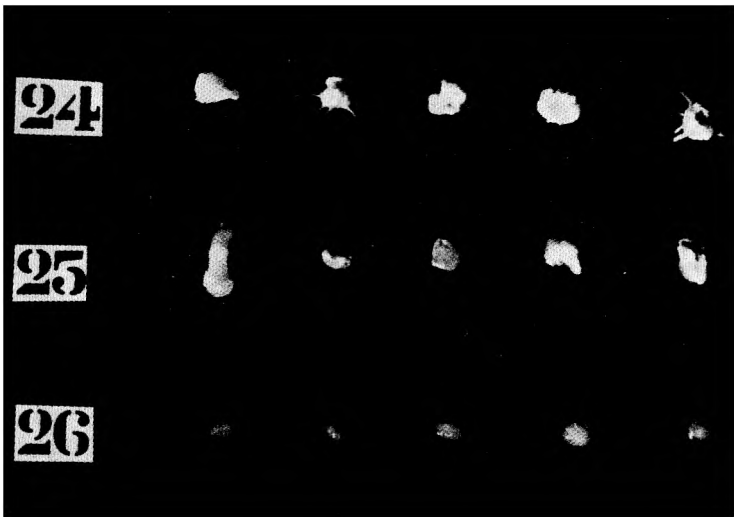
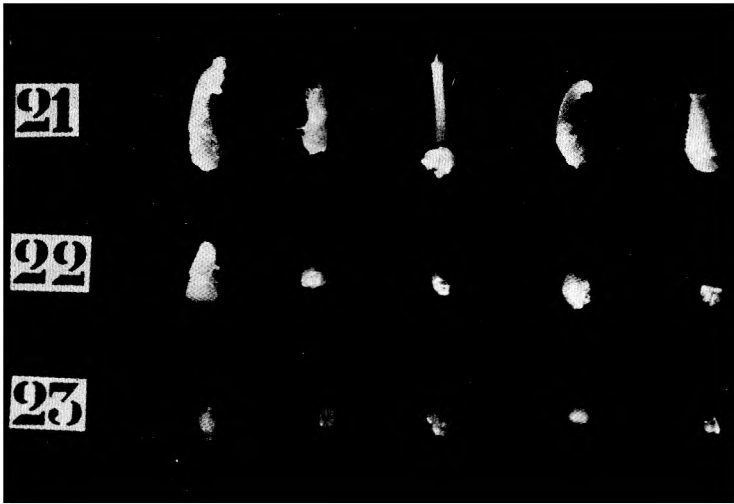


Tabla V. — Plate V.

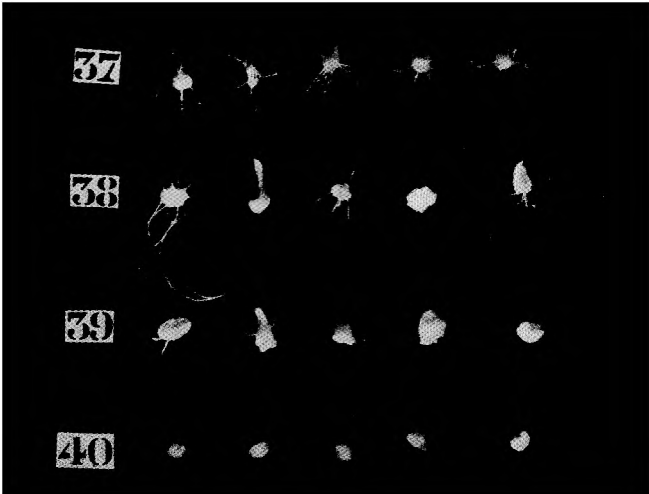
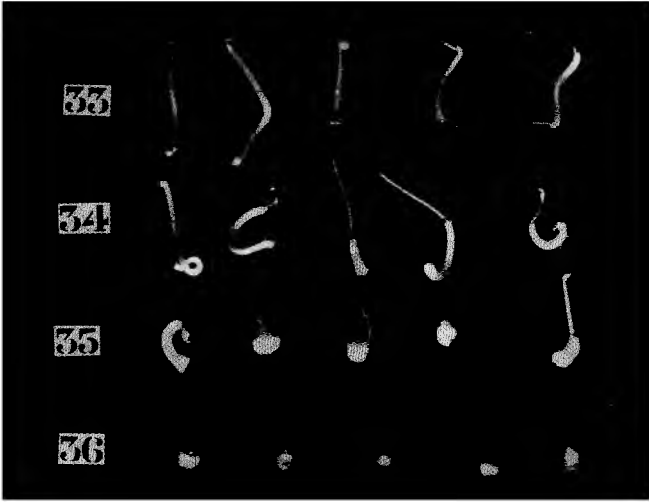


Tabla VI. — Plat VI.

Tabla III — Plate III.

Sl. 4. Djelovanje 2,4-D na A-segmente u koncentracijama:  $10^{-8}$  (1),  $10^{-7}$  (2),  $10^{-6}$  (3),  $10^{-5}$  (4).  
Hellerov medij.

Fig. 4. The effect of 2,4-D on A segments in concentrations:  $10^{-8}$  (1),  $10^{-7}$  (2),  $10^{-6}$  (3),  $10^{-5}$  (4).  
Heller's medium.

Sl. 5. Djelovanje 2,4-D na B-segmente u koncentracijama:  $10^{-8}$  (5),  $10^{-7}$  (6),  $10^{-6}$  (7),  $10^{-5}$  (8).  
Hellerov medij.

Fig. 5. The effect of 2,4-D on B segments in concentrations:  $10^{-8}$  (5),  $10^{-7}$  (6),  $10^{-6}$  (7),  $10^{-5}$  (8).  
Heller's medium.

Tabla IV — Plate IV.

Sl. 6. Djelovanje 2,4-D na B-segment. Koncentracije:  
a)  $10^{-8}$ , b)  $10^{-7}$ , c)  $10^{-6}$ , d)  $10^{-5}$ .

Fig. 6. The effect of 2,4-D on B segment. Concentrations:  
a)  $10^{-8}$ , b)  $10^{-7}$ , c)  $10^{-6}$ , d)  $10^{-5}$ .

Tabla V — Plate V.

Sl. 7. Djelovanje 2,4,5-T na A-segmente u koncentracijama:  
 $10^{-7}$  (21),  $10^{-6}$  (22),  $10^{-5}$  (23).  
Hellerov medij.

Fig. 7. The effect of 2,4,5-T on A-segments in concentrations:  
 $10^{-7}$  (21),  $10^{-6}$  (22),  $10^{-5}$  (23).  
Heller's medium.

Sl. 8. Djelovanje 2,4,5-T na B-segmente u koncentracijama:  
 $10^{-7}$  (24),  $10^{-6}$  (25),  $10^{-5}$  (26).  
Hellerov medij.

Fig. 8. The effect of 2,4,5-T on B-segments in concentrations:  
 $10^{-7}$  (24),  $10^{-6}$  (25),  $10^{-5}$  (26).  
Heller's medium.

Tabla VI — Plate VI.

Sl. 9. Djelovanje kinetina na A-segmente u koncentracijama:  
 $10^{-8}$  (33),  $10^{-7}$  (34),  $10^{-6}$  (35),  $10^{-5}$  (36).  
Hellerov medij.

Fig. 9. The effect of kinetin on A-segments in concentrations:  
 $10^{-8}$  (33),  $10^{-7}$  (34),  $10^{-6}$  (35),  $10^{-5}$  (36).  
Heller's medium.

Sl. 10. Djelovanje kinetina na B-segmente u koncentracijama:  
 $10^{-8}$  (37),  $10^{-7}$  (38),  $10^{-6}$  (39),  $10^{-5}$  (40).  
Hellerov medij.

Fig. 10. The effect of kinetin on B segments in concentrations:  
 $10^{-8}$  (37),  $10^{-7}$  (38),  $10^{-6}$  (39),  $10^{-5}$  (40).  
Heller's medium.

Hipokotil može pod utjecajem visokih koncentracija auksina ( $10^{-6}$  do  $10^{-4}$ ) pokazivati kalusni rast. To pokazuju pokusi sa zrelim embrijem graha (Gardiner, 1940). Narayanaswami (1959) pod utjecajem adenina (40 mg/l) i IAA (2 mg/l) opaža abnormalnu proliferaciju skuteluma embrija biljke *Pennisetum* sp. u vidu kalusnih nakupina, povećani koleoptil i zakočen rast osi »vršak-korijen«. Opsežni radovi, koje su izvršili van Overbeek i suradnici (1941, 1942) i van Overbeek (1942) značajan su prilog znanju o rastu embrija. Pokazali su da je zreli embrio vrste *Datura stramonium* sposoban sam sebi stvoriti faktore potrebne za rast i na sasvim jednostavnom mediju, koji je sadržao samo minerale i šećer, te izrasti u biljčicu. Proembrio te biljke u prisustvu kokosovog mlijeka se u tami za desetak dana razvija u embrio. Rast korijena bio je zakočen. Znači, kokosovo mlijeko sadrži »embrio-faktor«, koji uzrokuje proliferaciju stanica ili kontinuiranost meristemske aktivnosti. (Zna se da auksini u većoj koncentraciji izazivaju inhibiciju rasta korijenja, a tzv. »leaf-growth« faktor pojačano rasteње kotiledona). Taj efekt je u ovim pokusima opažen u prisustvu svjetlosti.

A-segmentu odgovaralo je tkivo hipokotila s vršnim meristemom, a B-segmentu donji dio hipokotila, koji je bio lišen korelacijskih odnosa. Submerzno zasadeni segmenti (sl. 1 i 2) uvijek su pokazivali mnogo slabiji rast od onih zasijanih površinski i slabo su se razvijali ne pokazujući nikakvu diferencijaciju. Na temelju ovog podatka mogli bismo zaključiti da oni pripadaju skupini tkiva visokog dišnog kvocijenta, kao npr. *Lupinus albus* (Ball, 1946), što ukazuje na to da svi primarni meristemi ne moraju biti karakterizirani niskom potrebom kisika. Efekt kisika na rast apikalnih meristema prikazali su u svojim radovima Wardlaw i Allsopp (1948).

Hellerov medij bio je najpogodniji od svih ispitanih hranidbenih podloga. Nakon mjesec dana kultiviranja A-segment produžio se u oko 4—5 cm dugi hipokotil sa slabo naznačenim vrškom (sl. 1). Jedino na kompletnom MS-mediju A-segment uzgajan na svjetlosti razvio se u normalnu biljčicu s dugim normalnim korijenjem i pravilnim listovima. A-segment bio je uvijek sposoban razviti na osnovnom mediju korjenčice, mađa slabe, npr. za razliku od A-segmenta vrste *Lupinus Hartwegii* Lindl (Lee 1955 a, b). Dodatak kokosovog mlijeka u koncentraciji 10% pogodio je razvitku hipokotila (tabela 5), a isto tako i dodatak same IAA u koncentraciji  $10^{-6}$  (sl. 3b). Zanimljivo je, da su A-segmenti nakon kultiviranja s adeninom bili normalni, možda čak i nešto snažniji, nego u kontroli. Prema podacima koje navodi Lee (1955a) dodatak samog adenin-sulfata u koncentraciji od 40 mg/l inhibirao je rast segmenata embrija. Upotrijebila sam prirodni adenin i to u znatno nižoj koncentraciji (0,1, 1 i 10 mg/l) i ne znam da li i u ovom slučaju visoke koncentracije ne bi djelovale inhibitorno. U pokusima koje je izveo Ball (1946) adenin-sulfat nije imao utjecaja na rast. Dodatak 0,5% ekstrakta kvasca kokosovom mlijeku također je dozvoljavao dobar rast hipokotila (tabela 5). Nakon mjesec dana kultiviranja B-segment bi se na osnovnom mediju razvio u kratki fragment hipokotila (0,5—1 cm) s korjenčicama na korijenskoj strani. Ovi su najčešće bolje razvijeni od onih na A-segmentu (sl. 2). IAA u koncentraciji od  $10^{-6}$  i  $10^{-5}$  pojačala je broj induciranih korjenčica (sl. 3b i 3c), poremetila polarnost njihovog javljanja, no također



zakočila njihov produžni rast. Razvoj hipokotila bio je snažno zakočen dodatkom hormona rasta u visokim koncentracijama. Tako dodatak 2,4-D ( $10^{-6}$ ) mediju, koji je sadržavao kokosovo mlijeko, priječi djelovanje C. M. te je razvitak hipokotila i korjenčića bio zakočen nasuprot rastu nediferenciranog staničja, koji je bio potaknut (tabela 5). Dodatak same 2,4-D u koncentraciji  $10^{-6}$  i  $10^{-5}$  Hellerovom osnovnom mediju također je pogodio razvitku nediferenciranog staničja (sl. 4 i 5) na štetu razvitka hipokotila i korijena, bez obzira da li se radilo o segmentu A ili B. Istu pojavu nalazimo i kod dodatka 2,4,5-T. Rizogeneza je bila jako inhibirana. Zajednički dodatak podlozi kinetina i IAA (obje u koncentraciji  $10^{-6}$ ) snažno su zakočili razvitak hipokotila, no nisu sasvim zakočili razvitak korijena (tabela 5). Sam kinetin u koncentraciji  $10^{-6}$  i  $10^{-5}$  (sl. 9) također je imao snažan inhibični efekt na razvitak hipokotila, no na Hellerovom mediju nije uvjetovao ni neki značajniji rast kalusa. Kinetin u koncentraciji  $10^{-7}$  omogućio je razvitak epikotila s vrškom. To je bio jedini slučaj u kome smo postigli da se epikotil produžio. U eksperimentima, koje je izvršio Ball (1946) mogle su se razviti biljčice iz izoliranih vrškova vrsta *Tropaeolum majus* i *Lupinus albus* u određenim uvjetima na Robbinsovom osnovnom mediju. U slučaju bundeve A-segment je jedino na MS-mediju i na svjetlosti bio sposoban narasti u normalnu biljku. To pokazuje da je tkivu embrija bundeve potrebna podloga mnogo bogatija mineralnim solima nego što su to npr. Robbinsov, Hellerov ili Whiteov medij.

### Zaključak

Koristeći metodu kulture biljnog tkiva, istraženo je morfogenetsko djelovanje niza stimulatora rasta na odrezane segmente zrelog embrija vrste *Cucurbita pepo* L. Na temelju ovih istraživanja moglo se zaključiti ovo: Segmenti embrija kultivirani submeržno nisu pokazivali svojstva organogeneze. Uzgajani su površinski na tri osnovna hranidbena medija (Hellerov, Robbinsov i Whiteov), od kojih je najpogodniji bio Hellerov. Na njemu je prirast svježje i suhe tvari bio najveći.

Na osnovnom hranidbenom mediju segmenti su se kultivirani površinski, diferencirali u hipokotil (A-segment 4—5 cm dužine, i B-segment 0,5—1 cm) i na proksimalnoj strani razvili korjenčiće. Korijenje je bilo u pravilu bolje razvijeno na B-segmentu.

Sprečavanje razvitka hipokotila i odsutnost bilo kakve organogeneze postignuto je visokim koncentracijama stimulatora rasta npr. 2,4-D u koncentracijama  $10^{-6}$  i  $10^{-5}$ , 2,4,5-T u koncentracijama  $10^{-6}$  i  $10^{-5}$  i samog kinetina u koncentracijama  $10^{-6}$  i  $10^{-5}$ . Zajedničko djelovanje IAA i kinetina sprečavalo je diferencijaciju hipokotila, no nije potpuno inhibiralo rizogenezu. Kinetin u koncentraciji  $10^{-7}$  pogodio je razvitku epikotila, iako je on bio slab zbog nepogodnosti osnovnog medija. Visoke koncentracije supstancija rasta npr. 2,4-D izazivale su dediferencijaciju stanica tzv. »embrijskog tipa« veličine oko 20  $\mu$ m.

\*

Srdačno zahvaljujem prof. dr Zvonimiru Devidéu, pročelniku Odjela za fiziologiju Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu, na savjetima i pomoći koje mi je pružao u toku rada.

## Literatura

- Ball, E. 1946. Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. Amer. J. Bot. 33, 301—318.
- Furuya, M. 1956. Effects of vapour of methyl 2,4-dichlorophenoxy-acetate on growth and differentiation in *Phaseolus vulgaris* L. II. Behaviour of decotylated embryos in germination in vitro and the role of cotyledons in formative response. Jap. J. Bot. 15, 270—284.
- Furuya, M. and Soma, K. 1957. The effects of auxins on the development of bean embryos cultivated in vitro. Tokyo Univ., J. Faculty Sci. III, 7, 163—198.
- Gautheret, R. J. 1942. Manuel technique de culture des tissus végétaux. 1. vol. Masson Ed. Paris.
- Gautheret, R. J. 1959. La culture des tissus végétaux. Masson Ed. Paris.
- Gardiner, M. S. 1940. The effect of beta-indole-acetic acid upon isolated plant embryos. Bull. Mt. Desert I., Biol. Lab. 22.
- Hannig, E. 1904. Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. I. Über die Kultur von Cruciferen-Embryonen ausserhalb des Embryosacks. Bot. Z. 62, 45—80.
- Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale de tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég. 14, 1—223.
- La Rue, C. D. 1947. Growth and regeneration of the endosperm of maize in culture. Amer. J. Bot. 34, 585—586.
- Lampton, R. K. 1953. Developmental and experimental morphology of the ovule and seeds of *Asimina triloba* Dunal. Thesis, Ann. Arbor.
- Lee, A. E. 1950. The growth in culture of intact seedlings and isolated seedling organs. Amer. J. Bot. 37, 312—318.
- Lee, A. E. 1955a. Growth in culture of excised portions of lupine embryos. Bot. Gaz. 116, 359—364.
- Lee, A. E. 1955b. Potentially unlimited growth of lupine callus. Bot. Gaz. 116, 364—368.
- Maheshwari, P. and Ranga Swamy, N. S. 1958. Polyembryony and in vitro culture of embryos of *Citrus* and *Magnifera*. Ind. J. Hort. 15, 275—282.
- Molliard, M. 1921. Sur le developpement des plantules fragmentes, C. R. Soc. Biol. 84, 770.
- Morel, G. 1956. Nouvelles methodes permettant de réaliser des cultures de tissus végétaux. Rev. Gén. Bot. 63, 314—325.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Phvsiol. Plant. 15, 473—497.
- Narayanaswami, S. 1959. Experimental studies on growth of excised grass embryos in vitro. I. Overgrowth of the scutellum of *Pennisetum* embryos. Phytomorphology 9, 358—367.
- Narayanaswami, S. and Norstog, K. 1964. Plant embryo culture. Bot. Rev. 30, 587—628.
- Norstog, K. J. 1955. The culture of excised ovules, endosperm and embryos of certain grasses. Thesis, Ann. Arbor. 168 p.
- Overbeek, van J. 1942. Hormonal control of embryo and seedling. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 10, 126.
- Overbeek, van J., Conklin, M. E. and Blakeslee, A. F. 1941. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. Science 94, 350—351.
- Overbeek, van J., Conklin, M. E. and Blakeslee, A. F. 1942. Cultivation in vitro of small *Datura* embryos. Amer. J. Bot. 29, 472—477.

- Raghavan, V. and Torrey, J. G. 1963. Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture. Amer. J. Bot. 50, 540—551.
- Rappaport, J. 1954. In vitro culture of plant embryos and factors controlling their growth. Bot. Rev. 20, 201—225.
- Sanders, M. E. 1950. Development of self and hybrid embryos in artificial culture. Amer. J. Bot. 37, 6—15.
- Sen, N. K. and Verma, G. 1957. Cultivation of tissue fragments of embryos and seedlings of control and vernalised seeds of mustard, T 102. Proc. 44th Indian Sci. Congr. 279.
- Straus, J. 1954. Maize endosperm tissue grown in vitro. II. Morphology and cytology. Amer. J. Bot. 41, 833—839.
- Wardlaw, C. W. and Allsopp, A. 1948. Experimental and analytical studies of pteridophytes. XII. The effect of different concentrations of oxygen an active and inactive meristem of ferns. Ann. Bot. (N. S.) 12, 157—168.
- White, Ph. R. 1943., A handbook of plant tissue culture. Tempe, Ariz. The Jaques Cattell Press. Inc.
- Zenktele, M., Hildebrandt, A. C. and Cooper, D. C. 1961. Growth in vitro of mature and immature carrot embryos. Phytion 17, 125—128.

## SUMMARY

### GROWTH OF FRAGMENTS OF MATURE PUMPKIN EMBRYOS CULTIVATED IN VITRO

*Sibila Jelaska*

(Institute of Botany, University of Zagreb)

The growth of the segments A and B of mature embryos of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) has been studied in vitro. The segments were 0,5—0,75 mm long. The segment A corresponded to the upper part of hypocotyl tissue with epicotyl and apical meristem, the segment B to the lower part of the hypocotyl, which was deprived of correlative relations.

The experiments have given the following results: When submerged, the embryo segments did not show any signs of organogenesis and the increase of fresh and dry weight was considerably smaller than in segments which were cultivated on the surface of the medium. From three different nutrient media, which were used, (Heller's Robin's and White's) Heller's medium was the most suitable one and caused the highest increase in fresh and dry weight of explants. However, the segment A was able to grow into a normal plant only on Murashige—Skoog medium. These facts are quite in agreement with our further investigations on the needs of pumpkin tissue for a basic medium rich in salts e. g. the MS-medium.

When cultivated on the surface of a basic nutrient medium, say Heller's medium, the segments differentiated into hypocotyls (the A-segments became 4—5 cm long, and the B-segments 0,5—1 cm) and into weak roots (on the proximal side of segments). The application of IAA in high concentrations ( $10^{-5}$ ) induced roots also on the distal part of the segments, especially on B-segments. As a rule the roots were more vigorously developed in B-segments.

The addition of coconut milk in concentration of 10<sup>0</sup>% stimulated the development of the hypocotyl, just as the addition of the IAA in a concentration of 10<sup>-6</sup>. It is interesting that after a cultivation with adenine the A-segments were more vigorous than in the control. An addition of 0,5% yeast extract to the medium containing coconut milk also allowed a vigorous growth of the hypocotyl.

In concentrations 10<sup>-6</sup> and 10<sup>-5</sup> the IAA increased the number of induced roots, disturbed the polarity of their formation and inhibited their elongation.

High concentrations of growth stimulators, as e. g. 2,4-D (10<sup>-6</sup> and 10<sup>-5</sup>) or 2,4,5-T (10<sup>-6</sup> and 10<sup>-5</sup>) inhibited any organogenesis. The addition of 2,4-D (10<sup>-6</sup>) to the medium containing coconut milk, prevented the action of coconut milk so that the development of hypocotyl and roots was inhibited as compared to the growth of undifferentiated tissue which was slightly stimulated.

In concentrations of 10<sup>-6</sup> and 10<sup>-5</sup>, kinetin had a strong inhibitory effect on the development of hypocotyl even without any addition of other substances. At a concentration of 10<sup>-7</sup> the kinetin enabled the development of the epicotyl with the apex.

The addition of both kinetin and IAA (both in concentration 10<sup>-6</sup>) strongly inhibited the development of hypocotyl.

In addition to the inhibition of the hypocotyl differentiation high concentrations of growth stimulators (e. g. 2,4-D) induced cell dedifferentiation and the appearance of cells of embryonic type, about 20 μm in diameter.

Dr Sibila Jelaska  
Odjel za fiziologiju  
Instituta za botaniku  
Sveučilišta u Zagrebu  
Rooseveltov trg 6/III, p. p. 933  
41001 Zagreb (Jugoslavija)