

DJELOVANJE SASTAVA HRANIDBENE
PODLOGE NA RAST KLONA K KALUSA
CRNOG BORA (*Pinus nigra* Arn.)

With Summary in English

BRANKA KOLEVSKA-PLETIKAPIĆ

(Botanički zavod Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno 20. 01. 1978.

Uvod

Općenito je poznato da je u uvjetima in vitro kultura tkiva crnogorica prilično teška. U posljednjem desetljeću sastavljeno je više sintetskih hranidbenih podloga na kojima je moguće kultivirati tkiva nekih vrsta. U tim istraživanjima rod *Pinus* zauzima značajno mjesto. Brown i Lawrence (1968) sastavili su prvi sintetski medij za uzgoj kalusnog tkiva vrste *Pinus palustris*. Kasnije je David (1970) učinio to isto za vrstu *Pinus maritima*. Konar (1974) sastavio je medij za kulturu kalusa vrste *Pinus gerardiana* i ispitao djelovanje pojedinih njegovih komponenti kao mineralnog sastava i ugljikohidrata na rast kalusa.

U ranijim istraživanjima autorica je sastavila sintetsku hranidbenu podlogu na kojoj je s uspjehom uzgojila kalus vrste *Pinus nigra* Arn. (Kolevska-Pletikapić 1974). U svojim daljnim istraživanjima željela je ispitati na koji način reagira određeni klon kalusa crnog bora na pojedine komponente ove podloge, pa je u ovom radu u tu svrhu varirala mineralni sastav, ugljikohidrat i dodatak vitamina.

Materijal i metode

Kao eksperimentalni materijal poslužio je kalus klona K crnog bora (*Pinus nigra* Arn.). Taj klon na indukcijskom mediju relativno brzo raste te ni nakon niza supkultura ne pokazuje znakove diferenciranja ksilemskih elemenata. Zbog tih osobina činilo se da je podesan za namjeravana istraživanja.

Nakon četvrtog presađivanja kalus klona K prenesen je na šest različitih podloga i to:

MS — podloga s Murashige-Skoogovim mineralnim i modificiranim organskim sastavom (= induksijski medij) (K o l e v s k a - P l e t i k a - p i ć 1974).

W — podloga s Whiteovim mineralnim sastavom (B u t e n k o 1964) i ostalim komponentama kao u induksijskom mediju.

H — podloga s Hellerovim mineralnim sastavom (H e l l e r (1953) i ostalim komponentama kao u induksijskom mediju.

T — podloga s Tripathijevim mineralnim sastavom (T r i p a t h i 1968) i ostalim komponentama kao u induksijskom mediju.

MSG — podloga s Murashige-Skoogovim mineralnim sastavom i glukozom (4%), umjesto saharoze, te ostalim komponentama kao u induksijskom mediju.

MSV — podloga s Murashige-Skoogovim mineralnim sastavom i dodatnim vitaminima: askorbinska kiselina 1, biotin 0,05, Ca-pantotenat 0,5, riboflavin 0,1, vitamin B₁₂ 0,01 mg/l i ostalim komponentama kao u induksijskom mediju.

Kulture su uzgajane pri temperaturi 26 °C ± 1 °C, pod umjetnim svjetlom (fluorescentne cijevi IPR 40W, 220V, 6500 °K) pri 16-satnom osvjetljavanju i 8-satnom mraku na dan te uz intenzitet rasvjete od 1250 ± 250 luxa.

Prirast svježe i suhe tvari utvrđen je nakon šest tjedana kulture u 10 replikacija.

Veličina pojedinih stanica određivana je na osnovi mjerenja njihovih prosječnih promjera. Stanice su nacrtane aparatom za crtanje, izmjerene su im dužina (a) i širina (b), a suma prosječnih promjera $\left(\frac{a+b}{2}\right)$ od 200 nasumce odabranih stanica, izraslih na svakoj od šest podloga, uzeta je kao vrijednost koja označava veličinu stanica u tom tkivu.

Za mikroskopska opažanja tkivo je fiksirano u smjesi FAA (formol-octena kiselina-70% etanol u omjeru 5:5:90) i bojeno metilenskim modrilom (G a m b o r g i W e t t e r 1975).

R e z u l t a t i

Nakon uspoređivanja kalusa klona K izraslog na podlogama MS, W, H, T, MSG i MSV uočene su razlike u prirastu svježe i suhe tvari, veličini stanica i diferenciranju traheidalnih elemenata.

Prirast svježe i suhe tvari. Pokazalo se da su izmijenjen mineralni sastav, drukčiji ugljikohidrat i dodatni vitamini u podlozi utjecali na rast kalusa klona K (sl. 1, 2 i 3). Iz prirasta svježe i suhe tvari (sl. 6 i 7) vidi se da je tkivo najmanje raslo na podlozi MSG, a samo nešto više na podlozi W. Više nego na spomenutim, raslo je tkivo na podlogama T i MSV, a najviše i s malim razlikama na podlogama H i MS.

Veličina stanica. Utvrđeno je da u kalusu klona K, izraslom na podlogama s različitim mineralnim sastavom, drugačijim ugljikohidratom i dodatnim vitaminima, postoje razlike u veličini stanica (sl. 8). Uspoređivanjem njihovih prosječnih promjera, pokazalo se da su najmanje stanice izrasle na podlozi MSG i T. Veće od ovih izrasle su stanice na podlozi H, a najveće i gotovo istih dimenzija na podlogama MS, W i MSV (sl. 9).

Iako su prosječni promjeri stanica izraslih na pojedinim podlogama neujednačeni, razlike u veličini stanica su proporcionalne s prirastom svježe i suhe tvari osim na podlozi W.

Sl. 1—3. Kalus klona *K* crnog bora izrastao na podlogama s različitim sastavom:

Fig. 1—3. Callus tissue of clone *K* of European Black Pine grown on media of various compositions:

Sl. 1. Kalus izrastao na podlozi s mineralnim sastavom prema Whiteu (W), Tripathiju (T), Helleru (H) i Murashige-Skoogu (MS) (indukcijski medij).

Fig. 1. Callus grown on media with mineral composition according to White (W), Tripathi (T), Heller (H) and Murashige-Skoog (MS) (induction medium).

Sl. 2. Kalus izrastao na Murashige-Skoogovoj podlozi s različitim ugljikohidratom: s glukozom (MSG) i saharozom (MS) (indukcijski medij).

Fig. 2. Callus grown on Murashige-Skoog medium with different carbohydrates: glucose (MSG) and sucrose (MS) (induction medium).

Sl. 3. Kalus izrastao na Murashige-Skoogovoj podlozi s dodatnim vitaminima (MSV) i bez njih (MS) (indukcijski medij).

Fig. 3. Callus grown on Murashige-Skoog medium with additional vitamins (MSV) and without them (MS) (induction medium).

Sl. 4 i 5. Traheidalne stanice u kalusu klona *K* crnog bora izrasle na podlogama s različitim mineralnim sastavima.

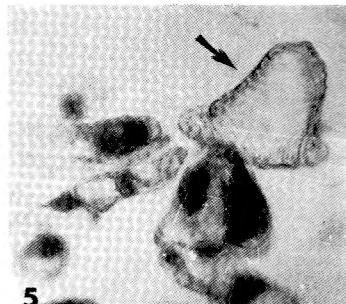
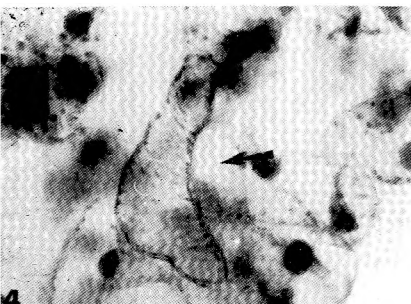
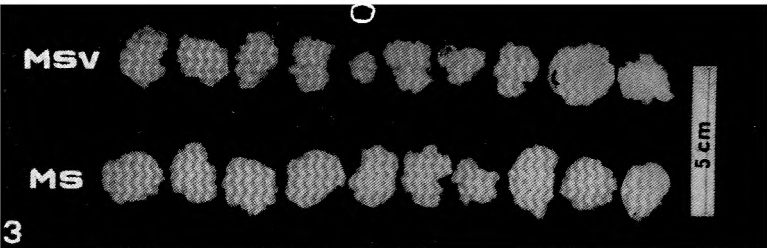
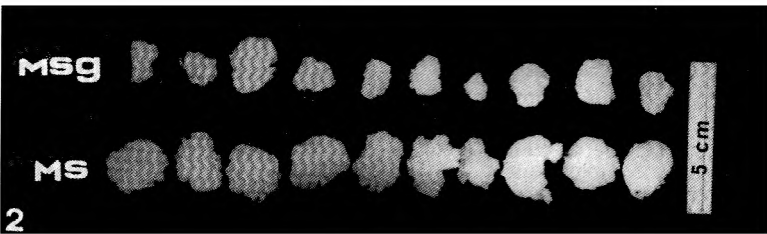
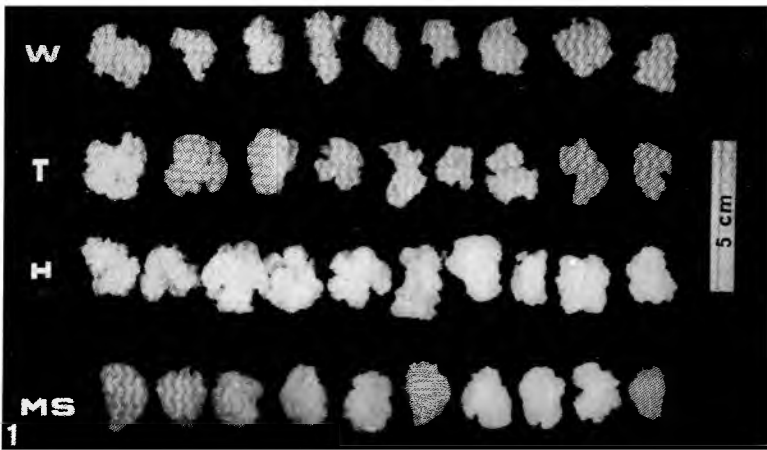
Fig. 4 and 5. Tracheidal cells in callus tissue of clone *K* of European Black Pine on media with different mineral composition.

Sl. 4. Traheidalna stanica izrasla na podlozi s mineralnim sastavom prema Helleru.

Fig. 4. Tracheidal cells grown on medium with mineral composition after Heller.

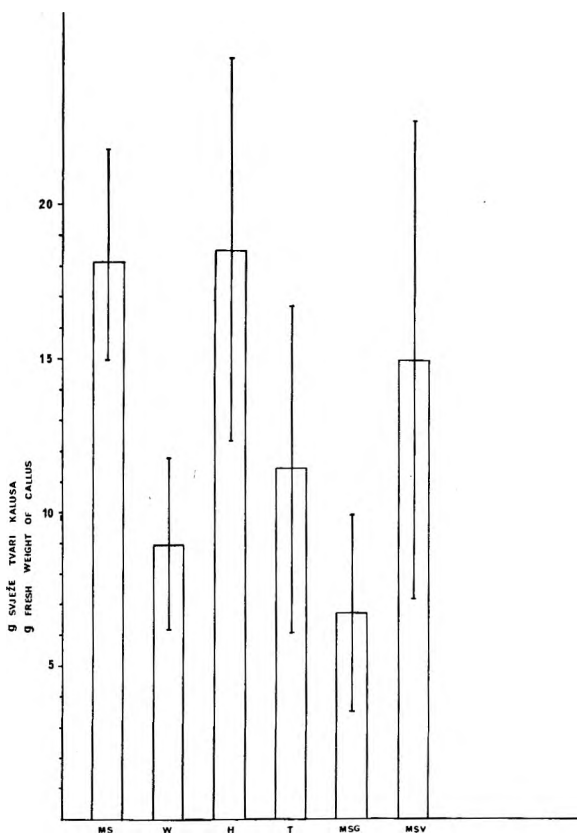
Sl. 5. Traheidalna stanica izrasla na podlozi s mineralnim sastavom prema Tripathiju.

Fig. 5. Tracheidal cells grown on medium with mineral composition after Tripathi.



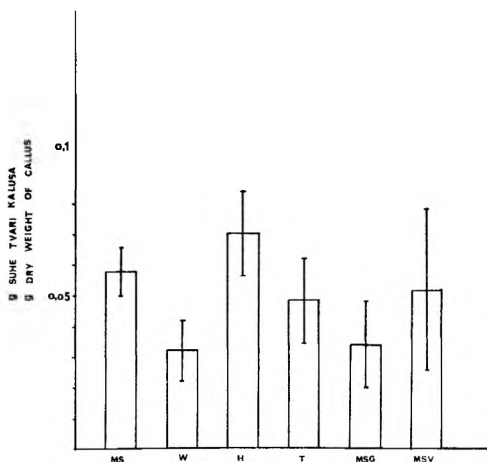
Sl. 1—5. — Fig. 1—5.

Diferenciranje traheidalnih elemenata. Pokazalo se da je mineralni sastav faktor koji može inducirati diferenciranje ksilemskih elemenata u kalusu klona K crnog bora. Naime, do diferenciranja traheidalnih elemenata došlo je jedino u kulturama izraslim na podlogama H i T. Te traheidalne stanice imaju veoma različite oblike koji, međutim, ne ovise o vrsti mineralnog sastava (sl. 4 i 5).



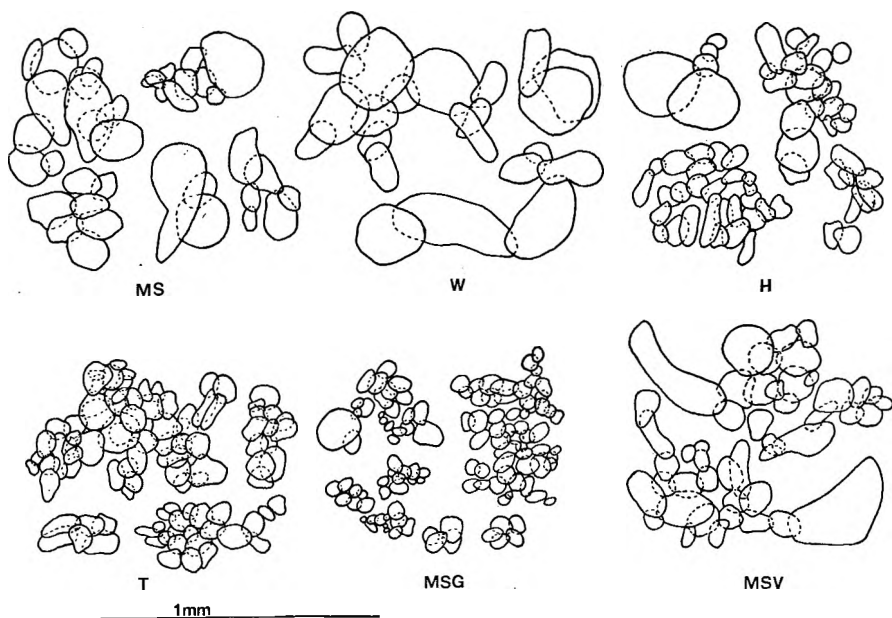
Sl. 6. Rast kalusa (svježa tvar) na podlozi s mineralnim sastavom prema Murashige-Skoogu (MS (indukcijski medij), Whiteu (W), Helleru (H) i Tripathiju (T) te na Murashige-Skoogovoj podlozi s glukozom (MSG) i dodatnim vitaminima (MSV).

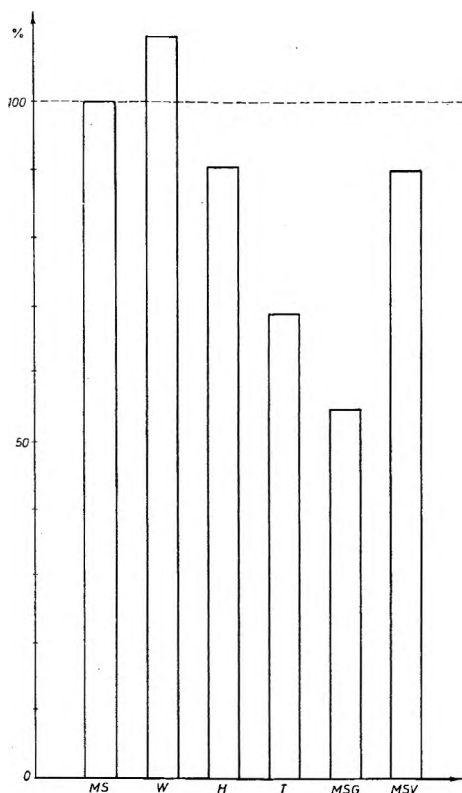
Fig. 6. Growth of callus (fresh weight) on medium with mineral composition after Murashige-Skoogu (MS) (induction medium), White (W), Heller (H) and Tripathi (T) and on Murashige-Skoog's medium with glucose (MSG) and additional vitamins (MSV).



Sl. 7. Rast kalusa (suha tvar) na podlozi s mineralnim sastavom prema Murashige-Skoogu (MS) (indukcijski medij), Whiteu (W), Helleru (H) i Tripathiju (T) te na Murashige-Skoogovoj podlozi s glukozom (MSG) i dodatnim vitaminima (MSV).

Fig. 7. Growth of callus (dry weight) grown on medium with mineral composition after Murashige-Skoog (MS) (induction medium), White (W), Heller (H) and Tripathi (T) and on Murashige-Skoog's medium with glucose (MSG) and additional vitamins (MSV).





Sl. 9. Veličina stanica, izražena u postocima prema veličini stanica na indukcijskom mediju (= 100%), koje su izrasle na mediju s mineralnim sastavom prema: Murashige-Skoogu (MS) (indukcijski medij), Whiteu (W), Helleru (H) i Tripathiju (T) te Murashige-Skoogovoj podlozi s glukozom (MSG) i dodatnim vitaminima (MSV).

Fig. 9. The size of cells grown on medium with mineral composition after Murashige-Skoog (MS) (induction medium), White (W), Heller (H) and Tripathie (T) on Murashige-Skoog's medium with glucose (MSG) and additional vitamins (MSV), expressed in percentage of the size of cells grown on induction medium (= 100%).

Sl. 8. Stanice kalusa izrasle na podlozi s mineralnim sastavom prema Murashige-Skoogu (MS) (indukcijski medij), Whiteu (W), Helleru (H) i Tripathiju (T) te na Murashige-Skoogovoj podlozi s glukozom (MSG) i dodatnim vitaminima (MSV).

Fig. 8. Callus cells on medium with mineral composition after Murashige-Skoog's (MS) (induction medium), White (W), Heller (H) and Tripathi (T) and on Murashige-Skoog's medium with glucose (MSG) and additive vitamins (MSV).

Diskusija

Iz prikazanih rezultata vidi se da je različit sastav makroelemenata i mikroelemenata značajno djelovao na rast, veličinu stanica i diferenciranje traheidalnih elemenata u kalusu klonu *K* crnog bora (*Pinus nigra* Arn.). Također i na isti način djelovao je izmijenjen ugljikohidrat, dok je utjecaj dodatnih vitamina bio manje djelotvoran.

Rast kalusa u kulturi rezultat je staničnih dioba i rasteanja samih stanica. Razlike u rastu kalusa na podlogama s različitim mineralnim sastavima mogle bi se protumačiti time da je tkivo na nekim od njih raslo prvenstveno diobom stanica (podloga T), na nekim diobom i rasteanjem stanica (podloge MS i H), dok je na nekim raslo uglavnom rasteanjem stanica (podloga W). Postignut slabiji rast kalusa klonu *K* crnog bora na podlozi s Whiteovim mineralnim sastavom u suprotnosti je s rezultatima Konara (1975) koji je, istražujući rast kalusa vrste *Pinus gerardiana* na ovom i Murashige-Skoogovom osnovnom mediju, dobio veći prirast svježe tvari na podlozi s Whiteovim mineralnim sastavom. Kalus crnog bora reagira na mineralni sastav, dakle, drukčije nego kalus vrste *Pinus gerardiana*.

Pokazalo se također da može u crnog bora pri indukciji diferenciranja ksilemskih elemenata mineralni sastav biti kritični faktor. Problema ksilogeneze bavio se veliki broj autora veoma dugi niz godina (vidi Roberts 1969, 1976). Indukcija diferenciranja ksilemskih elemenata mnogo je proučavana i u kulturi tkiva, koja je u tom pogledu dala nove mogućnosti. Iz rezultata tih istraživanja izlazi da središnju ulogu u procesima diferencijacije imaju auksini (Wetmore i Sorokin 1955) i citokinini (Fosket i Torrey 1969), izvor i sadržaj dušika (White i Gilbey 1966) i šećeri (Wetmore i Rier 1963). Mineralni sastav dosad nije navođen kao faktor koji može utjecati na diferenciranje ksilemskih elemenata. Torrey (1975) je pokazao u svojim novijim istraživanjima da će suspenzija stanica, u kojoj je moguće pratiti diferencijaciju pojedinih parenhimskih stanica, dati nove mogućnosti u istraživanjima fizičko-kemijskih faktora koji utječu na te procese. Možda će se tom metodom moći bolje istražiti i uloga anorganskih soli u procesima diferencijacije.

Vrsta ugljikohidrata u podlozi također znatno utječe na kalus crnog bora. Razlike u rastu tkiva izraslog na podlogama MS (s disaharidom saharozom) i MSG (s monosaharidom glukozom) veoma su izražene. Veći prirast tkiva na podlozi MS mogao bi se protumačiti znatnijim rastom stanica, dok je rast stanica na podlozi MSG bio vrlo ograničen. Kako je David (1970) dobio zadovoljavajući rast kalusa vrste *Pinus maritima* na podlozi s glukozom, i kako je Konar (1974) utvrdio da kalus vrste *Pinus gerardiana* raste ujednačeno na podlogama s obje ove vrste šećera, to možemo smatrati da i na ovu komponentu podloge crni bor reagira drukčije od drugih borova.

Dodavanje vitamina podlozi nije značajnije utjecalo na kalus crnog bora. Prirast tkiva na podlozi MSV bio je čak nešto niži od onog na podlozi MS. Istražujući djelovanje većeg broja vitamina na rast početne kambijalne kulture vrste *Pinus monticola*, Harvey (1967) utvrdio je da vitamini pospješuju rast tog tkiva, no ono ih ne zahtijeva, jer može rasti bez mnogih od njih. Uspoređujući njegov zaključak s ovdje izloženim rezultatima, možemo smatrati da na dodatak vitamina crni bor također reagira drukčije od spomenutog bora.

Z a k l j u č a k

Klon K kalusa crnog bora (*Pinus nigra* Arn.) uzgajan je na šest podloga različitog sastava pri čemu je određivan prirast svježe i suhe tvari, uspoređivana veličina stanica i praćeno diferenciranje traheidnih elemenata.

Rezultati su pokazali da na promjene u sastavu hranidbene podloge klon K nešto drukčije reagira od dosad istraživanih kalusa drugih vrsta borova time što:

- (1) bolje raste na podlozi s Murashige-Skoogovim nego Whiteovim mineralnim sastavom;
- (2) glukoza nepovoljno djeluje na njegov rast;
- (3) u diferenciranju njegovih ksilemskih elemenata mineralni sastav može biti kritički faktor.

*

Zahvaljujem prof. dru Z. Devidéu i dr Sibili Jelaska na mnogim korisnim savjetima u toku izrade ovoga rada.

L i t e r a t u r a

- Brown, C. L. and R. H. Lawrence, 1968: Culture of pine callus on a defined medium. *For. Sci* 14, 62—64.
- Butenko, R. G., 1964: Kultura izoliravanih tkanej i fiziologija morfogeneza rastenij. Nauka, Moskva, 1964.
- David, A. M., 1970: Obtention d'une souche de *Pinus pinaster* Sol. à partir de fragments d'hypocotyls. *C. R. Acad. Sc. Paris* 271, 1866—1868.
- Fosket, D. E. and J. G. Torrey, 1969: Hormonal control of cell proliferation and xylem differentiation in cultured tissues of *Glycine max. var. Biloxi*. *Plant. Physiol.* 44, 871—880.
- Gamborg, O. L. and L. R. Wetter, 1975: Plant tissue culture methods. Nat. Res. Coun. Canada, Prairie Reg. Lab. Saskatoon, 1975.
- Harvey, A. E., 1967: Tissue culture of *Pinus monticola* on a chemically defined medium. *Can J. Bot.* 45, 1783—1787.
- Heller, R., 1953: Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég.* 14, 1—223.
- Kolevska-Pletikapić, B., 1974: Callus culture of Austrian pine (*Pinus nigra* Arn.) on defined medium. *Acta Bot. Croat.* 33, 69—72.
- Konar, R. N., 1974: In vitro studies on *Pinus*. I. Establishment and growth of callus. *Physiol. Plant.* 32, 193—197.
- Roberts, L. W., 1969: The initiation of xylem differentiation. *Bot. Rev.* 35, 201—250.
- Roberts, L. W., 1976: Cytodifferentiation in plants. Cambridge Univ. Press.
- Torrey, J. G., 1975: Tracheary element formation from single isolated cells in culture. *Physiol. Plant.* 35, 158—165.
- Tripathi, B. K., 1968: Nutrition minérale et néoformation de racines par les tissus de Topinambur cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 226, 1123—1126.
- Wetmore, R. H. and J. P. Rier, 1963: Experimental induction of vascular tissues in callus of Angiosperms. *Am. J. Bot.* 50, 418—430.
- Wetmore, R. H. and S. Sorokin, 1955: On the differentiation of xylem. *J. Arnold Arbor. Harv. Univ.* 36, 305—317.
- White, P. R. and S. N. Gibbey, 1966: Sources of nitrogen for spruce tissue cultures. *Physiol. Plant.* 19, 177—186.

SUMMARY

THE EFFECT OF THE NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION ON CALLUS GROWTH
OF EUROPEAN BLACK PINE (*Pinus nigra* Arn.) — CLONE K

Branka Kolevska-Pletikapić

(Institute of Botany, Faculty of Science, University of Zagreb)

Callus tissue of European Black Pine (*Pinus nigra* Arn.) — clone K was cultivated on six culture media of various composition whereby the increase of fresh and dry weight has been determined, the cell size compared and the differentiation of tracheidal elements followed.

The results show that the clone K behaves somewhat differently from the callus tissues of other *Pinus* species, because:

(1) it grows better on media with the mineral composition after Murashige-Skoog than after White.

(2) its growth is not favored by glucose.

(3) in the differentiation of xylem elements the mineral composition seems to be the limiting factor.

Branka Kolevska-Pletikapić
Botanički zavod IV
Roosveltov trg 6/III, p. p. 933
Yu-41000 Zagreb (Jugoslavija)