

## MIKROPROPAGACIJA BIJELE TOPOLE (*Populus alba* L.)

### MICROPROPAGATION OF WHITE POPLAR (*Populus alba* L.)

Bojana PINTARIĆ\*

**SAŽETAK:** *Kultura je multiplicirana iz nodalnih segmenata i vrhova sterilnih izbojaka bijele topole (Populus alba L.) na osnovnoj podlozi: modificiranoj podlozi Woody Plant Medium (WPM; MS /Murashige i Skoog/ – makroelementi, WPM – mikroelementi i vitamini) uz dodatak 0,25 ili 0,5 mg/l BA (6-benziladenin). Stopa multiplikacije izbojaka na ovim podlogama bila je različita i iznosila je 5,36 po eksplantatu za M1 podlogu, tj. 5,86 za M2 podlogu u toku prvih pet pasaža. Međutim, u idućim pasažama došlo je do jasnog odvajanja linija, te se broj novih izbojaka po eksplantatu na podlozi M1 smanjio na prosječnih 1,8; dok se na podlozi M2 povećao na 13,45 po eksplantatu.*

*Stopa rasta biljnog materijala bijele topole, u uvjetima in vitro, bila je proporcionalna stopi multiplikacije na oba tipa podloga za multiplikaciju. Međutim, na podlozi M1 je u prvih pet pasaža stopa biljnog rasta bila izraženija u odnosu na podlogu M2, gdje se taj odnos vrlo brzo i jasno u iduće tri pasaže promijenio, tako da se za dugotrajniju uporabu ovih eksplantata u uvjetima kulture in vitro podloga M2 pokazala kao bolja.*

*Izolirani izbojci, veličine oko 3–4 cm, u uvjetima su se in vitro 100 % zakorjenili pri tretmanu zasađivanja na podlogu za zakorjenjivanje (Z) uz dodatak 0,1 mg/l IBA (indolbuterna kiselina) u trajanju od sedam dana i njihovog presađivanja na osnovnu podlogu bez hormona (BH) iduća tri tjedna. Ovako zakorijenjene individue uspješno su preživjele prijenos u sterilni zemljišni supstrat (zemlja i pijesak u omjeru 3:1) i aklimatizaciju u uvjetima in vivo.*

*Cljučne riječi:* *Populus alba* L. i mikropropagacija

#### 1. UVOD – Introduction

##### 1.2. Kultura in vitro i tipovi kultura – *Culture in vitro and the types of cultures*

Kultura *in vitro* je postupak koji podrazumijeva rast vrlo sitnih organa, komadića tkiva ili izoliranih stanica u aseptičkim (sterilnim) uvjetima. Sam naziv kultura *in vitro* označava uzgoj kultura u staklu ili prozirnim posudama. Ovaj način razmnožavanja biljaka često se naziva mikrorazmnožavanje, jer su biljni organi ili cijele biljke, u odnosu na generativnu proizvodnju, u mini-jaturnim dimenzijama. Sam postupak osigurava vrlo brz proces dobivanja velikog broja serija biljaka, koje su istovjetne po razvoju, rastu i genetičkom potencijalu

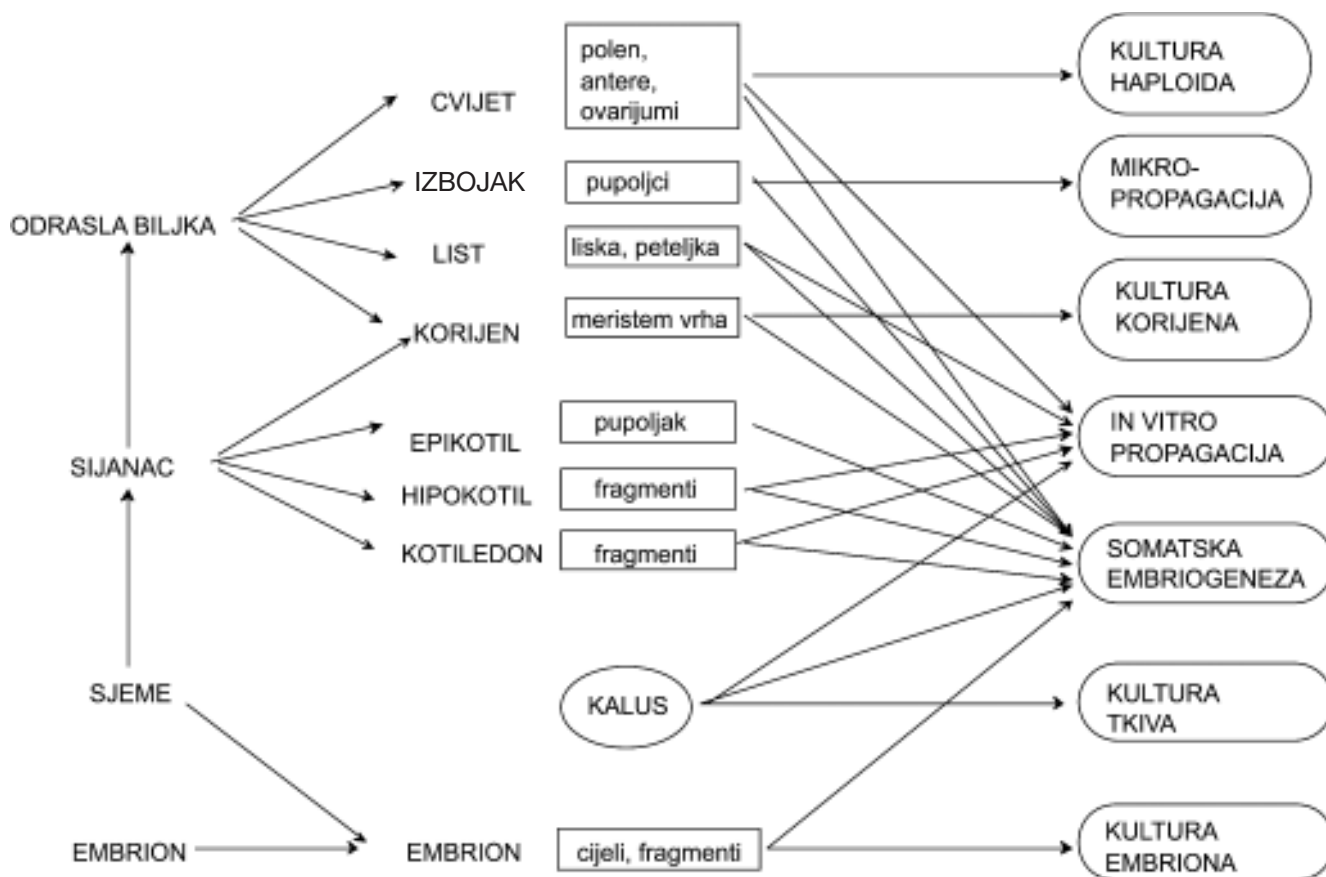
vrste. Bez sumnje, to je proces kloniranja, jer sve proizvedene biljke predstavljaju matične kopije razmnoženog majčinskog uzorka (Međedović 2003).

Postupci kulture *in vitro* mogu biti primijenjeni u raznim biotehnočkim i genetičko-inženjerskim zahvatima u smislu očuvanja i zaštite genofonda neke ugrožene vrste, razmnožavanja genetički superiornijih stabala, žalosnih formi drveća i grmlja, oblika otpornih na kemijski stres, zagađenost atmosfere, otpornost prema određenim pesticidima i herbicidima, itd. Kultura *in vitro* predstavlja najmoćnije oruđe moderne genetike i molekularne biologije u cilju israživanja rasta i razvoja biljaka, te njihove biokemije i fiziologije sekundarnih metabolita (Međedović 2003).

\* Dipl. ing. hort. Bojana Pintarić  
Ante Babića 3, Sarajevo

Postoje različiti pristupi u klasifikaciji tehnika kulture biljaka u uvjetima *in vitro*. Tehnike se mogu dijeliti ili po tipu eksplantata koji se uvodi u kulturu (ćelije, organi, tkiva) ili po namjeni (haploidi, somatska embriogeneza, somaklonarno variranje, itd.), što je predstavljeno na shemi br. 1. (Vinterhalter et Vinterhalter 1996).

Tri kronološki najstarije *in vitro* tehnike kod biljaka su: kultura tkiva (stanica), kultura embriona i kultura korijenova. Iako su odigrale važnu ulogu u općem razvoju tehnika kulture *in vitro*, na njima se danas vrši razmjerno malo istraživanja.



Shema 1. Tipovi eksplantata koji se koriste za pokretanje *in vitro* kultura (Vinterhalter et Vinterhalter 1996).

Sheme 1 The types of explants which are used for *in vitro* cultures initiation

### 1.2.1. Tipovi kulture *in vitro* – Types of culture *in vitro*

Višestanični biljni organizam izgrađuju različiti tipovi stanica i diferenciranih tkiva. S tim u vezi postoje i različiti tipovi kultura koje se imenuju prema organu, odnosno tipu tkiva početnog eksplantata. Tako se prema vrsti eksplantata razlikuju:

- Kultura cijelih (intaktnih) biljaka,
- Kultura embrija,
- Kultura korijena,
- Kultura antera,
- Kultura meristema,
- Kultura apikalnog i aksilarnog pupa i
- Kultura pojedinačnih nodija.

Ako se krene od definicije kulture *in vitro*, kao zajedničkoga nazivnika manipulacije biljnim uzorkom u sterilnim uvjetima, važnost definicije odnosi se samo na, u užem smislu riječi, kulturu neorganiziranih naku-

pina stanica, tj. kalusa. Međutim, uporabom eksplantata vršnog meristema izdanka stabla ili korijena procesi razvoja i diferencijacije bit će nastavljeni u istom smjeru (formiranjem izbojka ili korijena), što predstavlja organizirani rast. S druge strane, procesi proliferacije mogu biti usmjereni na kalusiranje, gdje se stanice umnožavaju bez inputa diferencijacije (neorganizirani rast).

Organizirani rast u kulturi *in vitro* nastaje proliferacijom početnog eksplantata u smjerovima koji su genetički determinirani u početnom biljnom uzorku. Uz vršne meristeme, organizirani rast nastavljaju i aksilarni meristemi, lisni zameci, mladi cvijetni pupovi i sl.

Neorganizirani rast javlja se kod eksplantata koji ne sadrže niti jednu poznatu strukturu iz biljnog organizma ili su s ograničenim brojem različito diferenciranih stanica. Ovom tipu kulture pripadaju (Međedović 2003):

- a) Tkivna kultura (kalus),
- b) Kultura stanica u suspenziji,

- c) Kultura pojedinačnih stanica (kultura polena) i
- d) Kultura protoplasta.

### 1.3. Mikropropagacija drvenastih vrsta – *Micropropagation of woody species*

Mikropropagacija je postupak u kojemu se za kultiviranje koriste isključivo izbojci stabla osovinskog porijekla, tj. vršni i pazušni pupoljci (Vinterhalter & Vinterhalter 1996). Postupak se zasniva na dodavanju egzogenih citokinina s ciljem aktiviranja postojećih pazušnih pupoljaka, odnosno izazivanja izduživanja njihovih internodija i formiranja listova, a zatim i novih pupoljaka u njihovom pazuhu.

Karakteristika metode je u tome da se kulture održavaju kao tzv. “kulture izbojaka”, koje u načelu nemaju korijenov sustav, sve dok se za tim ne ukaže potreba. Za podsticanje ožiljavanja koristi se podloga drukčijeg sastava, obično s auksinima, a eksplantati u ovoj fazi pojedinačni su izbojci isječeni s busenova, koji nakon ožiljavanja predstavljaju pojedinačnu individualnu biljku – rasad.

Postupak mikropropagacije razrađen je u prvoj polovici 70-ih godina na voćnim vrstama, a posebno na jagodama i podlogama za razne vrste roda *Prunus*. Pojava mikropropagacije bila je trijumf primjene metoda *in vitro* u klonskom razmnožavanju biljaka. Ona je omogućila izuzetno veliku brzinu razmnožavanja, i to tijekom cijele godine, u laboratorijskim uvjetima u kojima je moguće osigurati apsolutnu kontrolu uvjeta rasta i zdravstvenog stanja kultura. U kombinaciji s eliminacijom virusa, putem termoterapije i kulture meristema, mikropropagacija je ponudila skoro savršeno rješenje za savremenu rasadničku proizvodnju.

Prvi rezultati bili su povoljni, jer je pokazano da biljke proizvedene ovom kontinualnom kulturom meristema i pupoljaka u potpunosti zadržavaju svoja klonska svojstva i da se ni na koji način ne razlikuju od biljaka proizvedenih klasičnim postupcima. Također, objavljeni su radovi za razne, posebice voćne vrste u kojima je dokazano da su po nizu parametara koji definiraju kvalitetu ne samo sadnica već i plodova, biljke iz epruvete superiornije nad biljkama proizvedenim konvencionalnim putem.

Nešto kasnije pojavljuju se i suprotna mišljenja, posebno kada je u pitanju dobivanje i proizvodnja podloga oslobođenih od virusa (*virus-free*) za različite vrste, kod kojih je primijećena promjena (opadanje) sposobnosti ožiljavanja nakon oslobađanja od virusa.

Iako se o tome nije puno pisalo, znalo se da korištenje kalusa i uopće *in-vitro* tehnika može izazvati pojavu aberantnih (*off-type*) biljaka, što je krajnje nepoželjno u rasadničkoj proizvodnji, odnosno klonskom razmnožavanju. Međutim, početkom 1980-ih godina prošloga stoljeća Larkin i Scowcroft (Vinterhalter i Vinterhalter) ukazali su da varijabilnost

nastala tijekom ili kao posljedica korištenja metode kulture *in vitro* može biti korisna u selekciji i oplemenjivanju. Posebnost je dobila ime “somaklonalno variranje”, pod kojim se podrazumijevaju samo one promjene izazvane u kulturi *in vitro* koje postaju nasljedne. Bolje rečeno, samoklonalno variranje je rezultat promjene genotipa, a ne fenotipa. Međutim, metode kulture *in vitro* izazivaju i fenotipske, epigenetske, odnosno prolazne promjene, koje su za klonsko razmnožavanje neželjene, jer nužno nalažu detaljno ispitivanje prirode i uzroka svoga nastanka.

U šumarstvu metode kulture *in vitro* našle su primjenu i za klonsko razmnožavanje i u selekciji superiornih individua. Mikropropagacija može se koristiti kod čitavog niza dikotiledonih širokolisnih šumskih vrsta, kao što su topole.

Drvenaste vrste su puno zahtjevnije i teže se kultiviraju u uvjetima *in vitro* od zeljastih biljaka, zbog sljedećih razloga:

- 1) Drvenaste vrste imaju slabiju regeneracijsku mogućnost u usporedbi sa zeljastim biljkama,
- 2) Rejuvenilizacija kod drveća je, općenito teža,
- 3) Stopa umnožavanja mnogo je niža kod drvenastih vrsta, što je povezano njihovim dugotrajnim životnim ciklusom i
- 4) Drvenaste vrste podložnije su izlučivanju toksičnih tvari u hranjivu podlogu, itd. (Jelaska 1994).

Potrebno je napomenuti da osim primjene u rasadničkoj proizvodnji, klonsko razmnožavanje biljaka metodama kulture *in vitro* ima značajnu primjenu gdje god se radi selekcija i oplemenjivanje. Mikropropagacija i regeneracija izbojaka teme su za istraživanje i uspješnu primjenu genetičkog inženjeringa kod biljaka.

Mikropropagacija primjenjuje se kod:

- Brzog razmnožavanja novih genotipova,
- Čuvanja (održavanja) interesantnih genotipova,
- Ubrzanja, skraćivanja ili dovršavanja postupaka selekcije i oplemenjivanja te
- Regeneracije izbojaka i cijelih biljaka u genetičkom inženjerstvu.

U tablici 1. dana su dva široko rasprostranjena sustava za mikropropagaciju i klonsko razmnožavanje. Jedan od sustava predložio je Murashige i on obuhvaća ne samo mikropropagaciju u užem smislu (samo iz aksilarnih izbojaka), već sve sustave u kojima se kao rezultat *in vitro* kultiviranja mogu dobiti izbojci. Ovaj sustav pogodan je pri istraživačkom radu.

Iz prijedloga Debergh i Maene može se zamijetiti da se ožiljavanje izbojaka ne vrši u uvjetima *in*

*in vitro*, već se u međufazi IIIa izbojci izdužuju, a potom isijecaju i postavljaju u zemljišni supstrat kao i zelene reznice. Ovaj sustav pogodan je za masovno klonsko razmnožavanje.

Tablica 1. Faze mikropropagacije bilnog materijala (Vinterhalter et Vinterhalter 1996).

Table 1 Phases of micropropagation of the plant material (Vinterhalter et Vinterhalter 1996).

Operacija	Murashige, 1974.	Debergh i Maene, 1981.
Priprema, sakupljanje i transport materijala	<b>Faza I</b> Dobivanje kulture bez očiglednih zaraza; zadovoljavajući postotak preživjelih eksplantata u kulturi; brz rast eksplantata	<b>Faza 0</b> Higijenski uzgoj biljaka s kojih se uzimaju eksplantati
Površinska sterilizacija		<b>Faza I</b> Uspostavljanje aseptičnih kultura
Postavljanje primarnih eksplantata u uvjetima <i>in vitro</i>		<b>Faza II</b> Indukcija meristemskih centara, njihov razvoj u izbojke i multiplikacija
Provjera na zaraze (kontaminaciju)	<b>Faza II</b> Adventivna organogeneza izbojaka Stimulacija indukcije aksilarnih izbojaka	<b>Faza II</b> Indukcija meristemskih centara, njihov razvoj u izbojke i multiplikacija
Multiplikacija izbojaka		<b>Faza III a</b> Uniformno izduživanje izbojaka
Izduživanje izbojaka	<b>Faza III</b> Ožiljavanje izdanaka i presađivanje u zemljište	<b>Faza III b</b> <b>-ex vitro-</b> Isijecanje izduženih izbojaka, a zatim ožiljavanje i adaptacija tih reznica
Ožiljavanje izbojaka		
Aklimatizacija sadnica		

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA – The research goal

Cilj istraživanja je uspostavljanje sustava brze multiplikacije, zakorjenjivanja i aklimatizacije eksplantata bijele topole (*Populus alba* L.) na različitim podlogama.

Na ovaj način bi se omogućila eventualna primjena

ove tehnologije u rasadničkoj proizvodnji i ujedno njena primjena kao modela, u okviru praktičnih vježbi predmeta Fiziologija drveća i Kultura *in vitro*.

## 3. MATERIJAL I METODE RADA – Material and methods of work

### 3.1. Biljni materijal – Plant material

U ovom pokusu biljni materijal su bili eksplantati bijele topole (*Populus alba* L.) koji su uzgojeni u *in vitro* uvjetima u Italiji, (Firenze Scienze e Tecnologie Ambientali Forestali).



Slika 1. Izbojci bijele topole  
Picture 1 Sprouts of white poplar

### 3.2. Autoklaviranje i sterilizacija – Sterilization

#### 3.2.1. Površinska sterilizacija biljnog materijala – Surface sterilization of the herbal material

Površinska sterilizacija vrši se s ciljem da se sa površine primarnog eksplantata biljke uklone mikroorganizmi, koji bi prilikom uvođenja eksplantata u kulturu *in vitro* mogli kontaminirati hranjivu podlogu. Steri-

lizacija treba biti dovoljno jaka, kako bi se eliminirali mikroorganizmi, ali da istovremeno ne ubije i sam primarni eksplantat.

Površinska sterilizacija izvodi se tako da se vršni i bočni izbojci isijecaju, smiještaju u odgovarajuće flašice i tetiraju sredstvom za površinsku sterilizaciju. U tu svrhu najčešće se koristi 10 % otopina varikine (ili drugog komercijalnog izbjeljivača), koja sadrži 4–6 % Naphoklorit. Sterilizacija se vrši u Erlenmajer posudama, ili drugim pogodnim staklenim flašicama, koje se prethodno začepe aluminijskom folijom i autoklaviraju.

Površinska sterilizacija vrši se u laminarnom, specijalnom radnom prostoru sa sterilnim strujanjem zraka. U staklenu flašicu se pipetom doda kap detrdženta i 10 % otopine varikine. U ovoj fazi rada pipete ne moraju biti sterilne, a biljni materijal može se rukom ubaciti u flašicu sa sredstvom za površinsku sterilizaciju.

### 3.2.2 Autoklaviranje instrumenata – *Sterilization*

Instrumenti (skalpeli, pincete), filter papir i stakleno laboratorijsko posuđe sterilizirano je u suhom sterilizatoru, u trajanju od 1–3 sata na temperaturi od 180 °C.

### 3.3. Priprema hranjive podloge – *Preparation of nutritious base*

Tablica 2. Sastav osnovne podloge za multiplikaciju  
Table 2. Composition of primary base for multiplication

Sastav	Koncentracija (mg/l)
<b>Makroelementi</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650,00
KNO <sub>3</sub>	1.900,00
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	440,00
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00
<b>Mikroelementi</b>	
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	22,30
ZnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	8,60
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,25
<b>Željezo</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	37,30
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,80
<b>Vitamini</b>	
Thiamin HCl	1,00
Nikotinska kiselina	0,50
Pyridoxin-HCl	0,50
Glicin	2,00
<b>Šećeri</b>	
Myo-inositol	100,00
Saharoza	30.000,00
<b>pH</b>	5,7-6,2
<b>Agar</b>	9000

### 3.4. Rad u laminaru – *Laminar work*

Laminar je komora kroz koju u horizontalnom smjeru protiče sterilni zrak. Fini filteri ovoga aparata zadržavaju sve nepoželjne mikroorganizme, koji bi

Lisni materijal potopljen u, ovako pripremljenu otopinu za površinsku sterilizaciju, treba intenzivno promućkati 2–10 minuta, dok je standardno vrijeme za sterilizaciju pupoljaka u trajanju od 20–30 minuta. Po isteku vremena namijenjenog površinskoj sterilizaciji otopina varikine se odlije, zatim se u flašicu nalijeva autoklavirana (sterilizirana) voda. Uobičajeno je da se sterilizirana voda promijeni bar 3 puta u trajanju od 5 minuta u svakoj posudi.

Za uspješnost površinske sterilizacije izuzetno je važno da biljni materijal bude svjež.

Autoklaviranje je proces koji služi za sterilizaciju destilirane vode i magenti s podlogama te zaraženih medija s izbojcima, a vrši se u autoklavu na temperaturi od 120 °C u trajanju od 30 min.

U ovom radu je, kao osnovna podloga, korištena modificirana podloga “Woody Plant” (WPM), osim makroelemenata koji su pripremljeni prema recepturi za Murashige i Skoog (MS) podlogu, što se vidi u tablici 2. (Murashige i Skoog 1962.)

U podlozi za multiplikaciju korištene su dvije različite kombinacije biljnih regulatora rasta: 0,5 mg/l BA (M1) i 0,25 mg/l BA (M2); dok je podloga za zakorjenjivanje zahtijevala pasazu biljaka na podlozi sa 0,1 mg/l IBA (Z) u trajanju od sedam dana, nakon čega su presađene na medij bez hormona (BH) (Tablica 3).

Tablica 3. Koncentracije biljnih regulatora rasta u korištenim podlogama.

Table 3. Concentration of herbal plant growth regulators in used bases

Podloga	Sastav	BA mg/l	IBA mg/l
<b>M1</b>	Osnovna podloga	0,50	/
<b>M2</b>	Osnovna podloga	0,25	/
<b>Z</b>	Osnovna podloga	/	0,10
<b>BH</b>	Osnovna podloga	/	/

mogli dospjeti do podloge ili uzorka u procesu inokulacije. Laminar posjeduje UV lampe, koje se uključuju najmanje jedan sat prije početka rada.

Prije unošenja uzoraka, podlogâ i instrumenata neophodnih za rad u laminaru, potrebno je isključiti UV lampe, osigurati cirkulaciju sterilnog zraka barem 15 minuta prije početka rada, te ruke i radni pult laminara prebrisati 96 % etilnim alkoholom (Međedović 2003).

Unutar laminara nalazi se špiritna lampa i čaša s alkoholom, u kojemu se drže sterilni skalpeli i pincete, zbog kontinuiranog steriliziranja na otvorenom plamenu.

#### 3.4.1. Obrada biljnog materijala – *Processing of the plant material*

Materijal koji je površinski sterilan i ispran sterilnom vodom, treba sterilnom pincetom prenijeti na sterilnu podlogu na dalju obradu, tj. isijecanje skalpelom.

U ovoj fazi pupoljci se skraćuju na način da se skal-

Rad u laminaru obuhvaća sljedeće faze mikropropagacije:

- Obrada biljnog materijala,
- Multiplikacija izbojcima,
- Izduživanje izbojaka i
- Ožiljavanje

pelom odsijeca ranjeno mjesto gdje je pupoljak bio odsječen prije površinske sterilizacije. Uz to, pupoljcima, bez obzira da li su otvoreni ili ne, treba ukloniti vanjske listiće.

#### 3.4.2. Multiplikacija izbojcima – *Multiplication by sprouts*

Za svaku biljnu vrstu potrebno je empirijski, tj. istraživanjem, definirati formulu i balans biljnih hormona koji će suzbiti pojavu i rast nediferenciranog kalusa i favorizirati samo rast vršnog i aksilarnih meristema. Dominantnu ulogu u regulaciji imaju citokinini (BAP; 6-benzil aminopurin), kinetin (6-furfuril aminopurin), 2iP (izopentil adenin) i zeatin. Citokinini omogućavaju da se aksilarni pupoljci oslobode apikalne dominacije, odnosno da se slobodno izdužuju. Jednostavnije rečeno, u fazi multiplikacije koriste se hranjive podloge s citokininima koji stimuliraju izduživanje svih pupoljaka na eksplantatu.

Prosječna dužina trajanja pasaža (subkulture) u fazi multiplikacije izbojaka iznosi 4–5 tjedana. Ovakve kulture rastu dok ne utroše sav medijum (podlogu) u koji su posađene. Kod mnogih dikotiledonih vrsta nakon 4–5 tjedana trajanja pasaža rast prestaje i kulture se počinju sušiti, iako u flašicama ima još uvijek neiskorištenog medijuma. Dužina trajanja pasaža izravno ovisi od temperature komore za gajenje kultura, i to tako što

se skraćuje s porastom temperature. Ukoliko želimo produžiti vrijeme trajanja pasaža, kulture možemo prenijeti u hladnu sobu ili frižider.

Osnovni parametar multiplikacije je tzv. “indeks multiplikacije”, koji pokazuje prosječan broj novih pupoljaka koji se tijekom subkulture razvijaju iz jednog (pojedinačnog) pupoljka i koji se mogu koristiti kao eksplantati u sljedećem pasažu. Najčešće, medijumi za multiplikaciju uz citokinin sadrže i jedan auksin, obično IBA, i to u koncentraciji od 0,1–0,2 mg/l, u kojoj IBA potpomaže bolje izduživanje eksplantata.

Koncentracija BAP od 0,5 do 1,0 mg/l je optimalna za multiplikaciju velikog broja različitih dikotiledonih biljaka, jer podloga za multiplikaciju izbojaka treba omogućavati nesmetani rast i umnožavanje eksplantata, a da istovremeno ne izaziva obilnije kalusiranje.

Pouzdanost se može reći da je hormonski par BAP/IBA najčešće korišteni par hormona u mikropropagaciji, posebno kod dikotiledonih vrsta.

#### 3.4.3. Izduživanje izbojaka – *Sprouts elongation*

Kod nekih biljnih vrsta preporučuje se da se između faza multiplikacije i ožiljavanja ubaci jedna međufaza, tzv. faza izduživanja (elongacije). Svrha ove faze može

biti višestruka, ali uglavnom služi da omogući dovoljno dugačke izbojke za fazu ožiljavanja.

#### 3.4.4. Ožiljavanje – *Rooting*

Za ožiljavanje se koriste izduženi izbojci, obično ne manji od 10 mm, koji se isijecaju s busenova i prenose

na podlogu za ožiljavanje.

#### 3.5. Aklimatizacija – *Acclimatization*

Aklimatizacija je završna faza mikropropagacije. U njoj se ožiljene biljke vade iz posuda, u kojima su bile kultivirane i rasađuju u zemljišni supstrat. Prije same sadnje korijenov sustav se vodom ispiru od zaostalnih čestica agara.

Kod skoro svih dikotiledonih biljaka, listovi formirani tijekom rasta u *in vitro* uvjetima ne mogu funkcionirati u uvjetima uobičajene, niske relativne vlažnosti zraka, kakva normalno vlada u vanjskoj sredini. Aklimatizacija se upravo i vrši s ciljem da se *in vitro* sadnica prilagodi toj niskoj vlažnosti zraka.

Aklimatizacija se obično obavlja u plastenicima i staklenicima, a sadnica zasađena u kontejnerima štiti se plastičnom folijom 2 do 4 tjedna, odnosno dok ne krene formiranje novih listova.

Što se tiče zemljišnog supstrata u koji se prenose biljke, ožiljene *in vitro* radi daljeg uzgoja, potrebno je

omogućiti takvu mješavinu komponenti koja će dati supstratu sitnu mrvičastu strukturu i dobru aeraciju. U tu svrhu može se koristiti mješavina treseta i pijeska, a po potrebi i perlita.

### 3.6. Metode rada – *Methods*

Uobičajeni rad odvija se kroz sljedeće faze mikropropagacije:

1. Prikupljanje materijala za mikropropagaciju,
2. Površinska sterilizacija,
3. Obrada biljnog materijala,
4. Uspostavljanje inicijalne kulture,
5. Multiplikacija izbojaka,
6. Izduživanje izbojaka,
7. Ožiljavanje izbojaka i
8. Aklimatizacija.

Biljni materijal korišten u ovom eksperimentu potiče iz laboratorije Firenze Scienze e Tecnologie Ambientali Forestali i on je već bio uveden u kulturu, tako da su se u ovom radu izvodili samo postupci pod rednim brojevima 5–8, tj. multiplikacija izbojaka, izduživanje izbojaka, ožiljavanje izbojaka i njihova aklimatizacija.

Naime, biljke su u sterilnim (aseptičnim) uvjetima vađene iz Erlenmajer posuda i pomoću skalpela odstranjeni su oštećeni listovi i eventualni kalus. Potom je stabalce segmentirano na pojedinačne eksplantate s barem jednim nodijem, veličine 1–2 cm. Ovako secirani eksplantati su prebacivani na svježju podlogu za multiplikaciju.

Prenos eksplantata na svježe podloge vršio se svakih 28–35 dana, što je, zapravo, i predstavljalo vrijeme supkultivacije (pasažiranja). Naime, usporavanje i zaustavljanje rasta eksplantata nastupa zbog osiromašenja hranjiva, sušenja agara, produkcije otrovnih bioproizvoda i smanjenja količine oksigena u unutrašnjosti posude, tako da je potrebno samo zdrava tkiva subkultivirati.

Na podlogama za multiplikaciju nastojalo se vršiti umnožavanje izbojaka, tj. indukcija diferencijacije no-

vih izbojaka iz bočnih pupoljaka. Otprilike, nakon mjesec dana lako su se mogli uočiti i odstraniti novi bočni ogranici od matičnog stabalceta.

U Erlenmajer posude, s podlogama za multiplikaciju je inokulirano u prosjeku po deset eksplantata.

Dio eksplantata je “žrtvovan” u različitim vremenskim intervalima kako bi se izmjerile i dobile srednje vrijednosti svježe i suhe mase. Masa suhih uzoraka određivana je tako što su se uzorci prvo sušili četiri sata u termostatu na temperaturi od 105 °C. Masa svježih eksplantata, kao i masa suhih eksplantata određivana je na analitičkoj vazi.

Po 3–5 izbojaka koji su postigli visinu od 3–4 cm prebacivani su u Erlenmajer posude s podlogom za zakorjenjivanje, a nakon sedam dana u Erlenmajer posude s podlogom bez hormona, što je na kraju rezultiralo pojavom korjenčića i kompletiranjem biljaka.

Na ovaj način, dobivene biljčice sa razvijenim korjenovim sustavom su potom presađivane u zemljišni supstrat (sterilna smjesa zemlje i pijeska u omjeru 3:1) i prilagođivani na *ex vivo* uvjete života.

Kulture su održavane u klima komori za rast biljaka, gdje su kontrolirani uvjeti temperature (25–28 °C), relativne vlažnosti zraka (60–80 %), intenziteta svjetlosti (3.000 lx) i fotoperiodizma (16 sati svjetlosti i 8 sati mraka).

Zasađene biljčice u teglama bile su prvih sedam dana pokrivene staklenim čašama i redovno zaljevane sterilnom vodom. Tijekom ovih sedam dana čaše su “uklanjane”, u početku par minuta, a kasnije sve duže, dok se osmi dan čaše nisu potpuno uklonile i biljke počele zaljevati nesterilnom vodom.

## 4. REZULTATI RADA – The results of investigation

### 4.1. Faza multiplikacije – *Multiplication phases*

Na osnovne podloge za multiplikaciju, modificirani Woody Plant Medium (WPM) uz dodatak 0,25 mg/l BA (*M1*) ili 0,5 mg/l BA (*M2*) presađeni su sterilni izbojci i njihovi dijelovi, različitih veličina. Izbojci su presađivani (pasažirani) sukcesivno svakih 4–5 tjedana tijekom devet mjeseci izvođenja eksperimenta (od XI 2006. do VI 2007. godine).

U ovom periodu zamijećeno je da se izbojci drukčije ponašaju na navedenim podlogama. Naime, zbog pro-

cjene potencijalne multiplikativnosti i stope multiplikacije date vrste potencijalni eksplantati razdvajani su s matičnog eksplantata i presađivani na novu podlogu.

Tijekom prvih pet, od osam pasaža, bila je prisutna umjerena stopa multiplikacije na obje podloge, tako da je na podlozi *M1* iznosila 5,36 po eksplantatu, a na podlozi *M2* 5,86 po eksplantatu. Međutim, u sljedećim pasažama došlo je do značajne promjene, te se broj novih izbojaka po eksplantatu na podlozi *M1* smanjio na



Slika 2. Kultura bijele topole u klima komori  
Picture 2 Culture of white poplar in climate chamber

prosječnih 1,8; dok se na podlozi *M2* povećao na 13,45 po eksplantatu. Izbojci su bili vitalni, normalnog oblika i boje za bijelu topolu, ali različite visine.

Može se reći da je multiplikacija bila 100 % uspješna, i da su novodobiveni izbojci, ovisno o visini, korišteni za: daljnju multiplikaciju, određivanje svježe i suhe mase eksplantata ili zakorjenjivanje.

Nakon “žrtvovanja” eksplantata i prikupljanja podataka svježe i suhe mase izračunali su se i osnovni



Slika 3. Kulture bijele topole nakon četiri sedmice kultiviranja  
Picture 3 Cultures of white poplar after four weeks of cultivation

statistički podaci (tablica 4) za stopu rasta biljnog materijala u uvjetima *in vitro*. Iz datih podataka može se vidjeti da izbojci uzgajani na podlozi *M1* imali su srednje vrijednosti prirasta svježe mase od 0,04022 g i suhe mase od 0,00888 g, tj. u sljedećem kontrolnom mjerenju srednju vrijednost svježe mase od 0,03588 g i suhe mase od 0,00630 g. S druge strane, eksplantati na podlozi *M2* su imali srednje vrijednosti svježe mase od 0,03851 g, tj. 0,00743 g i suhe mase od 0,02988 g i 0,01397 g.

Tablica 4. Pregled statističkih vrijednosti svježe i suhe mase eksplantata.

Table 4 Review of statistic values of fresh and dry explantat mass

Mjerenje	Statistički parametri	<i>M1</i> podloga		<i>M2</i> podloga	
		Svježa masa (g)	Suha masa (g)	Svježa masa (g)	Suha masa (g)
1.	Min.	0,00632	0,00063	0,00378	0,00186
	Max.	0,10864	0,06729	0,11671	0,01833
	Stand.dev.	0,02812	0,01417	0,02875	0,00437
	Aritm. sred.	0,04022	0,00888	0,03851	0,00743
	Koef. var.	0,69924	1,59533	0,74651	0,58763
2.	Min.	0,00738	0,00219	0,00660	0,00146
	Max.	0,09248	0,01342	0,09322	0,08566
	Stand.dev.	0,02058	0,00294	0,02066	0,02129
	Aritm. sred.	0,03588	0,00630	0,02988	0,01397
	Koef. var.	0,57368	0,16612	0,69142	1,52470

#### 4.2. Faza zakorjenjivanja – Rooting phases

Za zakorjenjivanje su se koristile podloge *Z* (sa 0,1 mg/l IBA) i *BH* (bez hormona). Naime, u cilju inicijacije formiranja korijenčića su izbojci, veličine 3–4 cm, presađivani na podlogu *Z*, na kojoj su kultivirani idućih sedam dana. Nakon toga su, ovako tretirani izbojci, ponovo prebacivani na svježju podlogu i to podlogu bez hormona, na kojoj je dolazilo do razvoja korijenovog sustava. Zakorjenjivanje je bilo stopotno za obje linije multipliranih izbojaka.



Slika 4. Kompletne individue u magenti  
Picture 4 Complete individuals in magenta



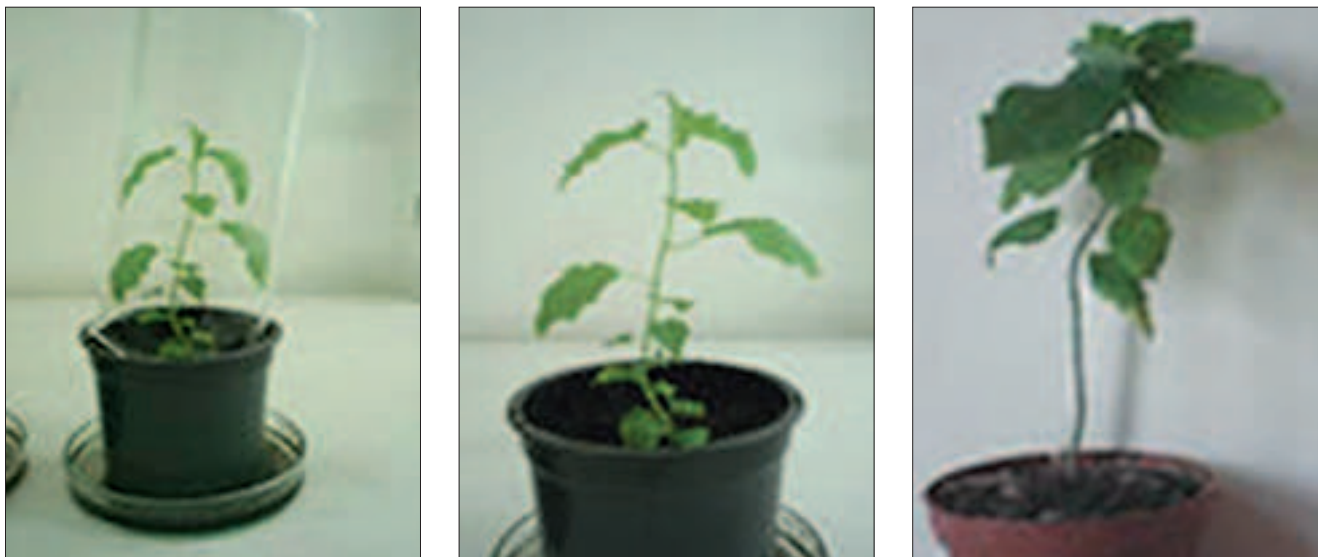
Slika 5. Kompletna individua  
Picture 5 Complete individua



### 4.3. Faza aklimatizacije – *Aclimatization phases*

U ovoj fazi ožiljene su biljke prenešene iz sterilnih posuda u kojima su bile kultivirane i zasađene u zemljišni supstrat (zemljište i pijesak u omjeru 3:1) izvan klima komore.

Naime, korijenov sustav je bio očišćen od čestica podloge s agarom pomoću mlaza sterilne destilirane vode, pa su biljke presađivane u zemljišni supstrat, koji je prethodno steriliziran sa fungicidom. Ove mlade



Slika 6. Faza aklimatizacije bijele topole (neposredno pri zasađivanju; nakon sedam dana; nakon tri mjeseca).  
Picture 6 *Aclimatization phase of the white poplar*



Slika 7. Aklimatizirane biljke bijele topole na uvjete *ex vitro*.  
Picture 7 *Aclimated plants of white poplar on ex vitro conditions*

biljke nisu imale dovoljno razvijenu kutikulu, funkcionalan stomatalni aparat, dobru vaskularnu vezu između korijena i izbojka, slabo razvijene korijenske dlačice, itd., te je bilo potrebno postepeno ih navikavati na uvjete *ex vivo*. To je postignuto privremenom zaštitom mladih biljaka sa sterilnom staklenom čašom, čije otklanjanje je strogo kontrolirano i vremenski se produžava svaki dan kako bi došlo do razmjene plinova. S druge strane, prvih sedam dana ove su biljke zaljevane sa sterilnom destiliranom vodom, a nakon toga običnom vodom iz vodovodnog sustava.

Iako je ova faza često kritična, sve presađene individue aklimatizirale su se na uvjete relativne niske vlažnosti zraka, koji vladaju u vanjskim uvjetima, tj. uvjetima *ex vitro*.

## 5. RASPRAVA – Discussion

U *in vitro* uvjetima, a u cilju multiplikacije izbojaka, vrsta *Populus alba* je vrlo dobro reagirala. Upotrijebljena tehnika multiplikacije u ovom radu bila je učinkovita i brza, te se može široko primjenjivati u mikroprogaciji brzorastuće bijele topole.

Stopa multiplikacije na podlozi *M1* je iznosila, u prosjeku 5,36, odnosno u iduće tri pasaže samo 1,8 izbojaka po eksplantatu, dok je na podlozi *M2* bila dosta drukčija situacija. Naime, stopa multiplikacije je na podlozi *M2* u prvih pet pasaža iznosila 5,86, a po-

tom se povećala na 13,45. Iz dobivenih rezultata moglo se uočiti da je na ponašanje eksplantata bijele topole, u uvjetima *in vitro*, najviše utjecaja imao balans egzogeno dodatih hormona u podlogu. Dugoročno gledano, u našem eksperimentu, je eksplantatima više odgovarala veća koncentracija BA hormona (0,5 mg/l) u podlozi, jer nije dolazilo ni do kakve vidljive promjene u izgledu izbojaka i stvaranja kalusa, već samo do povećanja brojnosti novih izbojaka, a nakon prosječnih četiri tjedna kultiviranja.

Međutim, Douglas et al. (preuzeto iz Jelaska 1994) i Međedović et al. (2006) navode da zeatin značajno utječe na regeneraciju eksplantata topole, što je Beganović (2001) u svom diplomskom radu, potvrdila ali na materijalu vrste *Populus tremula* L. Naime, Beganović (2001) je u svom radu izvršila usporedbu ponašanja eksplantata jasike na različitim podlogama i izvijestila da je u njenim pokusima najbolja podloga za multiplikaciju bila WPMZ s dodatkom 1,0 mg/l zeatina, i to čak 50 % u odnosu na MS podlogu s istom količinom ovog hormona rezultatima, što se podudara s podacima koje su naveli Gözükmizi et al. (1998). U istom radu, Beganović (2001) navodi da je maksimalan broj izbojaka po eksplantatu iznosio 17, dok je u našem eksperimentu iznosio 16.

Dobiveni rezultati u ovom radu o stopi multiplikacije donekle se poklapaju i s dobivenim podacima o stopi rasta biljnog materijala. Naime, mjerenjem svježe i suhe mase eksplantata, na obje podloge, moglo se uočiti da su izbojci imali ravnomjeran prirast. Ali, na podlozi M1, iako je došlo do smanjenja broja novih izbojaka po eksplantatu, ipak je došlo do povećanja srednjih vrijednosti masa izbojaka. S druge strane, na podlozi M2 došlo je do smanjenja povećanja mase izbojaka, što se i očekivalo, s obzirom na to da je došlo do znatnog povećanja broja izbojaka po eksplantatu. Očit uzrok uočenoj pojavi je odnos novonastalih individua i količine pristupačnih hranjivih materija, tj. prave borbe za prostor i opstanak individua.

Chun et al. (1986) navode da na *in vitro* razmnožavanje *Populus alba* x *Populus grandidentata*, tj. masu izbojaka i njihov broj po eksplantatu utiče konzistencija hranjive podloge. Naime, oni su imali znatno bolje rezultate u tečnim nego na čvrstim podlogama, i to skoro u dvostruko većim vrijednostima mjerenih parametara. Isti autori navode da su zamijetili da se

povećavanjem broja eksplantata po posudi usporava rast eksplantata, smanjuje njihova masa, kao i da nastaje manji broj novih izbojaka. Također, Smith (2000) navodi da svježa masa općenito korelira sa suhom masom, s vrijednostima iznad 0,5 g.

U našem radu ostvareno je 100 % zakorijenjivanje jedinki na modificiranoj podlozi WPM uz dodatak 0,1 mg/l IBA, i to u trajanju od sedam dana. Nakon tog razdoblja jedinke su se prebacivale na modificiranu osnovnu podlogu bez hormona, na kojoj je dolazilo do dobrog razvoja korijenovog sustava, što je poslije potpomoglo i odličnu aklimatizaciju biljčica. Gözükmizi et al. (1998) u svom radu navode da je za većinu istraživanih klonova topola WPM sa 0,5 mg/l IBA omogućavala sto-postotno zakorijenjivanje biljaka; dok su WPM sa 2 mg/l IBA i 0,1 mg/l NAA bile djelimično uspješne. Beganović (2001) je u svojim pokusima najbolje rezultate rizogeneze ostvarila na WPM uz dodatak 0,5 mg/l IBA.

Aklimatizacija zakorijenjenih biljaka bila je vrlo uspješna, jer su svi zasađeni primjerci bijele topole u smjesu zemlje i pijeska (omjera 3:1) preživjeli i nastavili s normalnim rastom. Naime, u laboratorij su biljke prenešene u zemljišni supstrat uz kontroliranje razmjene plinova i zaljevanje sterilnom vodom idućih sedam dana. Ovako tretirane biljke uspješno su aktivirale svoje sustave za fotosintezu i transpiraciju, poboljšale vaskularne veze između nadzemnog izdanka i korijena, povećale zaštitni sloj kutikule te izgradile relativno velik broj korijenskih dlačica, što im je omogućilo brzu prilagodbu na *ex vitro* uvjete.

Tijekom eksperimenta, na biljnom materijalu nisu primijećene fenotipske promjene, kako u uvjetima *in vitro* tako ni u uvjetima *in vivo*.

## 6. ZAKLJUČCI – Conclusions

Na temelju dobivenih rezultata multiplikacije, zakorijenjivanja i aklimatizacije, zaključili smo sljedeće:

- Uspješno je proveden postupak multiplikacije bijele topole (*Populus alba* L.) u *in vitro* uvjetima, i to na modificiranoj osnovnoj podlozi WPM uz dodatak 0,25 mg/l (M1) i 0,5 mg/l (M2) BA.
- Stopa multiplikacije je u prvim pasażama bila nešto manja i iznosila je u prosjeku 5,36, odnosno u iduće tri pasáže samo 1,8 izbojaka po eksplantatu (podloga M1), dok je na podlozi M2 iznosila 5,86, a potom se povećala na 13,45.
- Mjerenjem svježe i suhe mase eksplantata (stope rasta biljnog materijala) uočilo se da je na podlozi M1 došlo do smanjenja broja novih izbojaka po eksplantatu, ali i do povećanja srednjih vrijednosti masa izbojaka, dok je na podlozi M2 došlo do

smanjenja povećanja mase izbojaka i znatnog povećanja broja izbojaka po eksplantatu.

- Ostvareno je 100 % zakorijenjivanje jedinki na modificiranoj podlozi WPM uz dodatak 0,1 mg/l IBA. Nakon sedam dana jedinke su s ove podloge prebacivane na modificiranu osnovnu podlogu bez hormona na kojoj se razvijao korijenov sustav u iduća tri tjedna.
- Aklimatizacija zakorijenjenih biljaka bila je uspješna, jer su svi zasađeni primjerci bijele topole u smjesu zemlje i pijeska (omjera 3:1) preživjeli i nastavili s normalnim rastom.
- Tijekom eksperimenta, na biljnom materijalu nisu primijećene fenotipske promjene, kako u uvjetima *in vitro* tako ni u uvjetima *in vivo*.

## 7. LITERATURA – References

- Beganović, S. 2001. Klonska propagacija topole (*Populus tremula* L.) u kulturi *in vitro*. Diplomski rad. Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo.
- Chun, Y. W., R. B. Hall, L. C. Stephens, 1986. Influences of medium consistency and shoot density on *in vitro* shoot proliferation of *Populus alba* × *P. grandidentata*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 5(3): 179–185.
- Gözükirmizi, N., K. Bajrović, Z. Ipecki, M. Boydak, T. Akalp, K. Tunctaner, H. Balkan, H. Tanriyar, M. Calikoglu, T. Ogras, Ö. Özden, M. Tulukcu, T. Tank, 1998. Genotype differences in direct plant regeneration from stem explants of *Populus tremula* in Turkey. *J. For. Res.* 3: 123–126.
- Jelaska, S., 1994. *Kultura biljnih stanica i tkiva*, Školska knjiga, Zagreb.
- Međedović, S., Dž. Ferhatović, 2003. Klonska proizvodnja sadnica drveća i grmlja. Bemust, Sarajevo.
- Smith, R. H., 2000. *Plant tissue culture. Techniques and experiments*. Second edition. Academic Press.
- Vinterhalter, D., B. Vinterhalter, 1996. *Kultura in vitro i mikropropagacija biljaka*, Axial, Beograd.
- [www.atlas-voslin.pl/gatunki/Populus\\_alba.htm](http://www.atlas-voslin.pl/gatunki/Populus_alba.htm)
- [www.fichas.infojardin.com/arboles/populus-alba-alamo-blanka-chopo-blanca.htm](http://www.fichas.infojardin.com/arboles/populus-alba-alamo-blanka-chopo-blanca.htm)
- [www.terra.hu/haznar/htm/Populus.alba.html](http://www.terra.hu/haznar/htm/Populus.alba.html)

*SUMMARY: The plant material used in this experiment derives from the laboratory Firenze Scienza e Tecnologia Ambientali Forestali. It had already been introduced into the culture so that in this paper we only conducted the procedures of shoot multiplication, shoot lengthening, shoot restoration and their acclimatization. Namely, the plants were taken from Erlenmeyer flasks in sterile (aseptic) conditions. The damaged leaves and the callus were removed with a scalpel. The tree was then segmented into individual explants with at least one node of 1–2 cm. The dissected explants were transferred to the fresh multiplication medium. The culture was multiplied in the basic medium: modified Woody Plant Medium (WPM; MS /Murashige and Skoog/ - macroelements, WPM – microelements and vitamins) with the addition of 0.25 or 0.5 mg/l BA (6-benzyladenine).*

*The explants were transferred to fresh mediums every 28–35 days, which in fact represented the subcultivation period (passaging) during the nine-month duration of the experiment (from November 2006 to June 2007). The growth of the explants was slowed or halted due to impoverished nutrients, the drying of the agar, the production of poisonous bioproducts and lower quantity of oxygen in the flask. Therefore, only the healthy tissue was subcultivated. The shoots were multiplied in multiplication mediums; in other words, new shoots were differentiated by induction from lateral buds. Approximately one month later new lateral branches could easily be identified and removed from the parent tree. At this period it was noticed that the shoots behaved differently in the mentioned mediums. In order to assess potential multiplication and the multiplication rate of a given species, the potential explants were separated from the parent explant and transferred to the new medium.*

*The shoot multiplication rate in these mediums varied and amounted to 5.36 per explant for M1 medium and to 5.86 for M2 medium during the first five passages. However, in the subsequent passages the lines were clearly separated and the number of new shoots per explant on M1 medium dropped to the average 1.8; whereas it rose to 13.45 per explant on M2 medium.*

*The growth rate of the plant material of white poplar under *in vitro* conditions was proportionate to the multiplication rate in both types of multiplica-*

tion mediums. However, plant growth rate in M1 medium was more distinct compared to M2 medium, where this relationship changed very quickly and clearly in the three following passages. Thus, the M2 medium proved superior for long-lasting use of these explants under *in vitro* cultures.

A part of the explants was “sacrificed” at different time intervals in order to obtain and measure mean fresh and dry mass values. After “sacrificing” the explants and collecting fresh and dry mass data, some basic statistical data were calculated (Table 4) for the growth rate of the plant material under *in vitro* conditions. According to the data, the shoots cultivated in the M1 medium had mean fresh mass values of 0.04022 g and dry mass of 0.00888 g. The subsequent control measurements showed the mean fresh mass value of 0.03588 g and dry mass value of 0.00630 g. On the other hand, the explants cultivated in the M2 medium showed fresh mass values of 0.03851 g and 0.00743 g and dry mass values of 0.02988 g and 0.01397 g.

Isolated shoots sized about 3-4 cm showed 100 % rooting under *in vitro* conditions after being planted into the rooting medium (Z) with the addition of 0.1 mg/l IBA (Indol Butric Acid) for seven days and their transplanting into the basic hormone-free medium (BH) in the following tree weeks. In the acclimatization stage, the rooted plants were transferred from the sterile containers in which they were cultivated into the soil substrate (soil and sand at 3:1 ratio) outside the chamber climate.

The root system was cleaned from the medium particles with agar using a spray of sterile distilled water. The plants were transplanted into the soil substrate previously sterilized with fungicide. These young plants did not have a sufficiently developed cuticula, a functional stomatal apparatus, a good vascular connection between the root and the shoot, well developed root hairs, etc., so it was necessary to acclimatize them gradually to the *ex vivo* conditions. This was achieved with temporary protection of the young plants with sterile glass containers. The removal of the containers was strictly controlled and the period of removal was lengthened every day in order to enable gas exchange. On the other hand, for the first seven days the plants were watered with sterile distilled water and after that with tap water.

Although this is usually a critical stage, all the transplanted individuals managed to acclimatize to relatively low air humidity prevailing in external conditions (*ex vitro* conditions). No phenotypal changes were observed on the plant material either in *in vitro* or *in vivo* conditions during the experiment.