

Stručni članak
Professional paper

Sanja Bogunović¹, Nevenka Čelepirović¹, Miran Lanščak¹, Anđelina Gavranović Markić¹, Zvonimir Vujnović¹,
Mladen Ivanković¹

MIKROPROPAGACIJA ŠUMSKIH VRSTA DRVEĆA U LABORATORIJU ZA KULTURU TKIVA HRVATSKOG ŠUMARSKOG INSTITUTA

SAŽETAK

Hrvatski šumarski institut od 2018. godine kroz Laboratorij za kulturu tkiva radi na razvitku protokola za mikropropagaciju najvažnijih i najugroženijih vrsta šumskog drveća u Republici Hrvatskoj. Sve intenzivnije klimatske promjene negativno utječu na stabilnost šumskih sustava, dok u isto vrijeme pogoduju pojavi novih, ali i pojačanom širenju već postojećih šumskih štetnika i patogena. Pronalazak i očuvanje superiornih genotipova koji bi mogli opstati u novonastalim okolnostima postaje sve važnije za očuvanje šuma, dok se uz pomoć mikropropagacije ovaj proces može višestruko ubrzati.

**Ključne riječi: banka gena; mikrorazmnožavanje; divlja trešnja; poljski jasen;
crna topola**

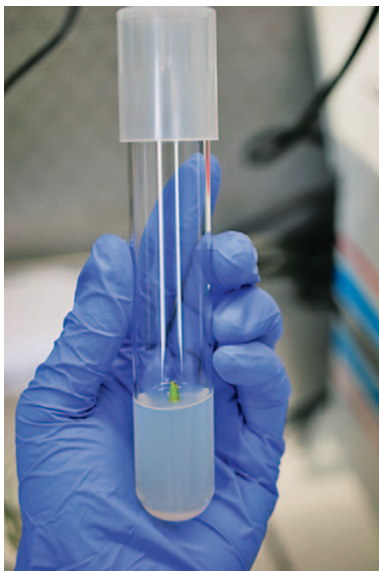
¹ Hrvatski šumarski institut, Zavod za genetiku, oplemenjivanje šumskog drveća i sjemenarstvo, Cvjetno naselje 41, 10 450 Jastrebarsko, Hrvatska

* Kontakt autor: Sanja Bogunović (sanjam@sumins.hr)

UVOD

Laboratorij za kulturu tkiva Hrvatskog šumarskog instituta (HŠI) započeo je s radom tijekom 2018. godine. Prema Zakonu o šumskom reprodukcijskom materijalu (NN 75/09, 61/11, 56/13, 14/14, 32/19, 98/19,) Službeno tijelo ustanovljava genetsku banku svojti šumskog drveća koju sačinjavaju zbirke tkiva, živi arhivi, šumski sjemenski objekti te nadzirane i uzgojene populacije. Sukladno tome, HŠI je osnovao Laboratorij za kulturu tkiva, a s krajnjim ciljem očuvanja genetske raznolikosti šumskog drveća. U laboratoriju se za potrebe kloniranja biljaka primjenjuje tehnika mikropropagacije. Mikropropagacija je relativno nova metoda razmnožavanja šumskog drveća u Republici Hrvatskoj. Ovom posebnom tehnikom vegetativnog razmnožavanja se iz malih dijelova biljnoga tkiva (eksplantata) ili stanica roditeljske biljke na specijaliziranim hranidbenim podlogama nastoje proizvesti zdrave presadnice (Paradžiković 2014). Sama metoda temelji se na svojstvu totipotentnosti stanice, odnosno njenoj sposobnosti da se dijeli i stvara sve diferencirane stanice odraslog organizma. Inokulacijom i uzgojem biljnih tkiva na specifičnim hranjivim podlogama, u strogo kontroliranim uvjetima, moguće je regenerirati novu biljku genetski istovjetnu roditeljskoj.

Postupak započinje odabirom biljke, odnosno stabla koje se želi klonirati. Nakon toga se sakuplja biljni materijal koji se propisno obilježava i skladišti unutar laboratorija. Eksplantati (najčešće pupovi) se prije obrade u sterilnim uvjetima moraju površinski dezinficirati radi uklanjanja mikroorganizama koji bi mogli kontaminirati hranjivu podlogu. Površinski dezinficirani pupovi se zatim u laminarnom kabinetu sa horizontalnim protokom čistog zraka čiste od vanjskih listića te prenose na odgovarajuću hranjivu podlogu u epruvete, staklenke ili druge odgovarajuće sterilne posude. Time je uspostavljena kultura tkiva in vitro (Slika 1.).



Slika 1. Eksplantat divlje trešnje u inicijalnoj fazi mikropropagacije

Nakon uspješnog uvođenja u kulturu biljke se određeno vrijeme razvijaju u klima komori u, za njih idealnim, uvjetima osvjetljenja, zračne vlage i temperature. Razvijenije biljke se zatim presađuju na hranjivu podlogu s pojačanim sadržajem hormona citokinina koji stimuliraju multiplikaciju, odnosno umnažanje pupova. Ova faza traje od 4-5 tjedana, sve dok kulture ne potroše sva hranjiva iz podloge na kojoj se razvijaju. Tijekom tog razdoblja, iz pupova koji su uvedeni u kulturu, razvijaju se novi pupovi koji se ponovno mogu koristiti kao eksplantati. Prosječan broj novih pupova koji se tijekom subkulture razvije iz jednog pupa je osnovni parametar multiplikacije i naziva se indeksom multiplikacije. Sljedeća faza podrazumijeva izduživanje izbojaka koje se postiže povećavanjem koncentracije hormona auksina u hranjivoj podlozi te, nakon što su izbojci dovoljno izduženi, prebacuju se na hranjivu podlogu za zakorjenjivanje ili ožiljavanje. Kada izbojci razviju dovoljan broj korjenčića, slijedi jedna od najosjetljivijih faza ove tehnike – aklimatizacija na uvjete in vivo, odnosno na vanjske uvjete. Pritom se biljke iz posuda u kojima su kultivirane presađuju u sterilni supstrat određenog sastava te se neko vrijeme održavaju u uvjetima visoke vlažnosti zraka. Krajnji ishod procesa su potpuno aklimatizirane sadnice sposobne za rast u vanjskim uvjetima.

Prema Yildizu (2012) na uspješnost mikropropagacije utječu:

a) Genotip

Sposobnost regeneracije biljaka u širokom je rasponu i razlikuje se između porodica i pojedinih vrsta, a može se razlikovati i unutar genotipova iste vrste. Smatra se da zeljaste biljke imaju bolji regeneracijski kapacitet od drveća i grmlja.

b) Fiziološki stadij matične biljke (roditeljske biljke)

Vegetativni biljni dijelovi lakše se regeneriraju od generativnih biljnih dijelova, a sposobnost regeneracije se smanjuje sa starošću biljke.

c) Izvor eksplantata

Biljke uzgajane u plastenicima su bolji izvor eksplantata od biljaka uzgajanih na otvorenom.

d) Starost eksplantata

Regeneracijska sposobnost starije biljke je obično niska. Što su dijelovi biljke koji se koriste kao izvor eksplantata stariji to je sposobnost umnožavanja biljke manja.

e) Veličina eksplantata

Veći eksplantati, poput listova ili hipokotila, sadrže veće količine nutritivnih rezervi te se stoga mogu lakše regenerirati u in vitro uvjetima od sitnih biljnih dijelova poput stanica.

f) Položaj eksplantata na matičnoj biljci

Razvoj eksplantata u in vitro kulturi može biti pod utjecajem mjesta na biljci gdje prikupljen. Viši dijelovi biljke, poput vršnih izbojaka u krošnji, smatraju se starijima od onih u bazalnom dijelu biljke.

g) Površinska sterilizacija eksplantata

Uspješnost mikropropagacije uvelike ovisi o zdravstvenoj ispravnosti eksplantata. Pritom je izrazito važan tretman površinske dezinfekcije biljnih dijelova prije samog uvođenja u kulturu kako bi se spriječila mogućnost njihove kontaminacije mikroorganizmima kojima su in vitro uvjeti pogodni za razvoj.

Isto tako, površinska dezinfekcija eksplantata ne smije biti prejaka kako ne bi oštetila biljno tkivo.

h) Hranjiva podloga

Hranjiva podloga je iznimno važna za razvoj kulture biljnog tkiva. Ona se sastoji od mikroelemenata, makroelemenata, vitamina, hormona, šećera te drugih spojeva i elementa važnih za razvoj biljaka. Svaka faza mikropropagacije (uvođenje u kulturu, multiplikacija, elongacija i zakorijenjivanje) zahtjeva posebnu recepturu. Isto tako, svaka vrsta, pa čak i genotip, zahtjeva specifičan sastav hranjive podloge.

i) Uvjeti u kulturi tkiva

Nakon što su eksplantati inokulirani na hranjivu podlogu, svoj razvoj nastavljaju u kontroliranim uvjetima temperature i vlage zraka. Biljke se razvijaju pod posebnim svjetlosnim spektrom u klima komorama sa regulacijom dana i noći (16 sati svjetla i 8 sati mraka) i pri temperaturi od 21 do 25 °C.

Kultura biljnih tkiva, a time i mikropropagacija, se primjenjuje u mnogim područjima kao što su biokemija, fiziologija, genetika i molekularna biologija, a primjenu je našla i pri očuvanju ugroženih i rijetkih biljnih vrsta i biljnog genofonda. Iz tog razloga se primjenjuje u procesu oplemenjivanja poljoprivrednih, hortikulturnih i ostalih drvenastih biljaka, a ujedno je i sastavni dio biotehnologije (Jelaska 1994).

Glavne prednosti primjene mikropropagacije jesu mogućnost dobivanja biljnog materijala oslobođenog od virusa i patogena te mogućnost proizvodnje vrlo velikog broja biljaka (klonova) u relativno kratkom vremenu. Ova metoda omogućava olakšano razmnožavanje vrsta kod kojih se to teško ostvaruje tradicionalnim metodama, uslijed otežanog klijanja sjemena ili odbacivanja cijepa zbog inkompatibilnosti reznica i podloga prilikom cijepjenja. Prednost mikropropagacije je, u odnosu na druge metode razmnožavanja, i u uštedama sredstava koja bi se inače trošila na zagrijavanje plastenika i drugih prostora te mogućnosti proizvodnje presadnica tijekom cijele godine.

Nedostaci mikropropagacije su česte infekcije inicijalnih kultura te otežano zakorijenjivanje drvenastih vrsta. Prilikom presadnje biljaka u in vivo uvjete, može doći do pojave neželjenih karakteristika kao što su grmolik rast ili povratak na juvenilne karakteristike. Biljke proizvedene ovom metodom mogu na terenu pokazivati osjetljivost na pojavu bolesti i štetnika, zbog čega nije preporučljiv uzgoj monoklonskih plantaža. Također, nakon određenog broja supkultura kalusnog tkiva ili stanica, može doći do smanjenja regenerativne sposobnosti biljaka. Nedostatak mikropropagacije je i potreba za visokim ulaganjima u opremu i rad prilikom osnivanja laboratorija, kao i u nastavku njegova rada i proizvodnji presadnica.

RADOVI U LABORATORIJU ZA KULTURU BILJNIH TKIVA HRVATSKOG ŠUMARSKOG INSTITUTA

U laboratoriju za kulturu biljnih tkiva Hrvatskog šumarskog instituta trenutno se primjenjuje tehnika mikropropagacije. U nastavku su navedene vrste šumskog drveća na kojima se do sada radilo te je prikazan kratak pregled istraživanja.

Divlja trešnja

Divlja trešnja (*Prunus avium* L.) je vrlo važna autohtona vrsta naših mezofilnih šuma. Osim što je cijenjena zbog svog tvrdog drveta, njezini plodovi služe kao izvor hrane za mnoge ptice i sisavce. Razmnožavanje divlje trešnje tradicionalnim metodama često je vrlo spor proces zbog nedostatka redovitih i dovoljnih količina prirodnog sjemena. Mikropropagacija odabranih elitnih genotipova najbrža je metoda za proizvodnju kvalitetnih presadnica koje se mogu koristiti za pošumljavanje ili podizanje klonskih sjemenskih plantaža. Biljni materijal korišten za mikropropagaciju prikupljen je na klonskoj sjemenskoj plantaži Polojec – Šartovac, Šumarija Kutina (Slika 2.).



Slika 2. Uzimanje biljnih uzoraka divlje trešnje na klonskoj sjemenskoj plantaži Polojec-Šartovac

Nakon površinske sterilizacije radi uklanjanja mogućih izvora kontaminacije, aksilarni pupovi su očišćeni od vanjskih listića te nasadjeni na odgovarajuću hranjivu podlogu.

Usljedila je faza umnažanja kojom se biljni materijal multiplicira, te faza zakorjenjivanja u kojoj se, primjenom određenih biljnih hormona, potiče rast korijena novonastalih izbojaka (Slika 3.).



Slika 3. Tri faze u razvoju divlje trešnje u uvjetima in vitro (uspostavljanje kulture, multiplikacija i zakorjenjivanje)

U idućoj fazi aklimatizacije koja se odvijala u plasteniku u uvjetima visoke zračne vlage i kontrolirane temperature, mlade biljke su se pripremale za rast u vanjskim uvjetima. Jednogodišnji rad Laboratorija za kulturu biljnih tkiva rezultirao je dobivanjem većeg broja izrazito vitalnih, bezvirusnih sadnica divlje trešnje čiji rast i razvoj će se nastaviti pratiti u daljnjem razdoblju (Slika 4.).



Slika 4. Aklimatiziranje presadnice divlje trešnje nastale mikropropagacijom

Poljski jasen

Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) je jedna od najvažnijih vrsta drveća u nizinskim poplavnim šumama Republike Hrvatske te najčešće dolazi u zajednici sa hrastom lužnjakom (*Quercus robur* L.). Posljednjih godina zamijećeno je pojačano sušenje poljskog jasena u Europi, ali i na cjelokupnom području Republike Hrvatske. Odumiranje stabala u šumskim sastojinama svih dobnih razreda na pojedinim lokalitetima stvara velike ekološke i gospodarske probleme te svrstava ovu vrstu u jednu od trenutno najugroženijih. Klimatske

promjene te poremećen odnos podzemnih i poplavnih voda dovele su do fiziološkog slabljenja poljskog jasena, a nakon pojave patogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya u interakciji sa ostalim patogenima, došlo je do rapidnog sušenja ove vrste. Glavni cilj projekta „Uspostavljanje protokola za mikropropagaciju poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl.)“ započeto 2020. godine, financiranog od strane Hrvatskih šuma d.o.o. jest razvijanje protokola za mikropropagaciju poljskog jasena i razvoj sadnica sposobnih za rast u vanjskim uvjetima. Time bi se omogućilo brzo i uspješno razmnožavanje najotpornijih i najkvalitetnijih stabala poljskog jasena što bi pridonijelo očuvanju ove vrste uslijed klimatskih promjena i napada patogena i štetnika. Osim toga, kultura tkiva poljskog jasena omogućila bi brzu proizvodnju većih količina sadnog materijala u kratkom vremenskom razdoblju kao i proizvodnju biljaka potpuno oslobođenih patogena i virusa što u konačnici smanjuje troškove proizvodnje. Biljni materijal korišten za mikropropagaciju prikupljen je na klonskoj sjemenskoj plantaži poljskog jasena Prvča na području UŠP Nova Gradiška te sa pojedinih potencijalno rezistentnih stabala pronađenih u šumama (Slika 5.).



Slika 5. Uzimanje biljnih uzoraka poljskog jasena na klonskoj sjemenskoj plantaži Prvča

Zbog jake infekcije biljnog materijala već u inicijalnoj fazi (Slika 6.), intenzivno se radi na dodatnim istraživanjima kojima bi se izvršila determinacija patogena koje onemogućavaju uspješan primitak biljaka.

Točnom determinacijom patogena odgovorilo bi se na pitanje da li je uzrok infekcije biljnog materijala vanjski ili je možda došao iz samog izoliranog pupa, te bi se na taj način moglo lakše pristupiti rješavanju problema.



Slika 6. Inficirani pupovi poljskog jasena nakon uvođenja u kulturu.

Crna topola

Crna topola (*Populus nigra* L.) je važna vrsta naših poplavnih područja čije je drvo izrazito popularno u drveno-prerađivačkoj industriji. Biljni materijal je prikupljen u sjemenskoj sastojini crne topole na području UŠP Osijek. Nakon uspješne inicijalne faze i faze multiplikacije testirane su različite verzije hranjivih medija za produljenje (Slika 7.).



Slika 7. Crna topola u fazi elongacije.

Nastaviti će se raditi na uspostavljanju potpunog protokola za mikropropagaciju ove vrste kako bi se mogle proizvoditi kvalitetne presadnice za potrebe osnivanja pokusa i daljnje istraživanje.

Ostale vrste

Osim navedenih vrsta, u laboratoriju se eksperimentalno radi na pronalaženju receptura za mikropropagaciju ostalih najvažnijih i najugroženijih vrsta šumskog drveća u Hrvatskoj –hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.), nizinskog brijesta (*Ulmus minor* Mill.), tise (*Taxus baccata*), šumskih voćkarica, itd.

RASPRAVA I ZAKLJUČCI

Najnovija istraživanja klimatskih promjena nagovještavaju porast koncentracije CO₂ u atmosferi kao i porast srednje godišnje temperature za 1.5-2°C (IPPC 2014). Posljedica toga biti će sve intenzivniji i učestaliji klimatski ekstremi, povećanja temperatura, učestalost i intenzitet suše s produljenim vegetacijskim periodom (IPPC 2014). Takav proces aridifikacije može biti okidač za novo sušenje šuma (Porter i sur. 1991), pri čemu biotički čimbenici imaju terminalnu ulogu (Gea-Izquierdo i sur. 2019). Neželjene posljedice tog procesa su smanjenje bioraznolikosti i otpornosti na štetne organizme, širenje invazivnih vrsta, šumski požari i oslobađanje CO₂, što će pridonijeti nestabilnosti šumskih ekosustava i pogodovati razvoju šumskih štetnika i patogena. Jedan od načina da se pokuša uspostaviti narušena ravnoteža jest pošumljavanje sa superiornim genotipovima koji bi mogli opstati u novonastalim okolnostima. U šumarstvu se za vegetativno razmnožavanje najčešće koristi metoda cijepjenja čime se dobiva sadnica genetski i fiziološki identična roditeljskom stablu od kojega su uzeti biljni dijelovi. Ovom metodom se može proizvesti mali broj biljaka, a nerijetko se javljaju i poteškoće. Mikropropagacija je relativno nova metoda razmnožavanja drveća u Republici Hrvatskoj. Biljke koje se uspješno uvedu u kulturu mogu se godinama čuvati u laboratorijskim uvjetima, time čineći genetsku banku najkvalitetnijih i najotpornijih jedinki, te se po potrebi iskoristiti za proizvodnju sadnica za pošumljavanje. Hrvatski šumarski institut će i dalje nastaviti intenzivno raditi na razvijanju mikropropagacije šumskih vrsta drveća kako bi u budućim izazovima klimatskih promjena pridonio očuvanju genetske raznolikosti šuma.

FINANCIRANJE

Ova istraživanja su sufinancirana sredstvima Ministarstva poljoprivrede kroz „Program planiranih radova za sjemensku štedionicu, genetsku i sjemensku banku svojti šumskog drveća“ te sredstvima Hrvatskih šuma d.o.o. kroz projekt „Uspostavljanje protokola za mikropropagaciju poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl.)“.

SUKOB INTERESA

Autori nemaju sukob interesa za prijaviti.

LITERATURA

Barić, L., Županić, M., Pernek, M. i Diminić, D. (2012). Prvi nalazi patogene gljive *Chalara fraxinea* u Hrvatskoj – novog uzročnika odumiranja jasena (*Fraxinus* spp.). Šumarski list, 136 (9-10), 461-468. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/91428>

Gea-Izquierdo G, Ferriz M, García-Garrido S, Aguín O, Elvira-Recuenco M, Hernandez-Escribano L, Martin-Benito D, Raposo R. Synergistic abiotic and biotic stressors explain widespread decline of *Pinus pinaster* in a mixed forest. *Sci Total Environ.* 2019 Oct 1;685:963-975. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.378. Epub 2019 Jun 14. PMID: 31247442. IPCC 2014 Climate change 2014: Impacts, adaptation and Vulnerability. In: BARROS VR, FIELD CB, DOKKENDJ, MASTRANDRE MD (eds). Cambridge University Press, Cambridge and New York

Jelaska S, 1994. Kultura biljnih stanica i tkiva, Školska knjiga, Zagreb, 5.str, 42 - 43 str., 215- 219 str., 88 -91. str

Milović, M., Kranjec, J. & Diminić, D. (2016) Current status of ash dieback disease *Hymenoscyphus fraxineus* in Croatia. U: Radojčić Redovniković, I., Radošević, K., Jakovljević, T., Stojaković, R., Gaurina Srček, V. & Erdec Hendrih, D. (ur.) Book of abstracts. Paradžiković N, 2014. Principi florikulture, Predavanja, Sveučilišni preddiplomski studij na Sveučilištu J.J.Strossmayer u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek, 21. str.

Porter JH et al. 1991 The potential effects of climatic change on agricultural insect pests. *Agricultural and Forest Meteorology* 57:221-240

Yildiz M, 2012. The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration, Open access peer reviewed chapter <https://www.intechopen.com/chapters/40187>

MICROPROPAGATION OF FOREST TREE SPECIES IN THE LABORATORY FOR PLANT TISSUE CULTURE OF THE CROATIAN FOREST RESEARCH INSTITUTE

SUMMARY

Since 2018, the Laboratory for Plant Tissue Culture of Croatian Forest Research Institute has been working on the development of protocols for micropropagation of the most important and most endangered forest tree species in the Republic of Croatia. Increasing climate changes negatively affect forest systems stability, favouring the emergence of new and increasing the spread of existing forest pests and pathogens. Finding and preserving superior genotypes that could survive in the changed conditions is becoming increasingly important for forest conservation. By applying the micropropagation technique, this process can be accelerated many times.

Keywords: gene bank; micropropagation; wild cherry; narrow leaved ash; black poplar