

SADRŽAJ

PREDGOVOR	12
1. KADA I KAKO SAM ZAVOLELA DRVEĆE	13
2. LABORATORIJA ZA <i>IN VITRO</i> KULTURU BILJNOG TKIVA	17
UVOD	22
1. DRVO	23
1.1. Legenda o drvetu	23
1.2. Prvi istorijski zapisi o biljkama	26
1.3. Umetnost oblikovanja drveta	27
1.4. Drvo kroz geološko vreme	28
1.5. Lekovitost drveća	30
1.6. Ksiloteka-biblioteka “drvnih” vrsta	31
2. ZNAČAJ ŠUMA I STRATEGIJA RAZVOJA ŠUMARSTVA U SRBIJI	32
3. ZAKLJUČCI I PREDLOZI	37
LITERATURA	38

1. POGLAVLJE

<i>BILJNE ĆELIJE I KULTURA TKIVA IN VITRO: ALTERNATIVE ZA UMNOŽAVANJE, PROIZVODNJU SEKUNDARNIH METABOLITA I BIOTEHNOLOGIJE ZA UNAPREĐENJE ŠUMSKOG DRVEĆA</i>	40
1. UVOD	41
2. <i>IN VITRO</i> PROPAGACIJA DRVEĆA	50
2.1. Kultura izdanaka	51
2.2. Rejuvenilizacija u kulturi <i>in vitro</i>	53
2.3. Hranljive podloge	53
2.4. Regeneracija biljaka	54
2.4.1. Somatska embriogeneza	54
2.4.2. Sekundarna somatska embriogeneza	56
2.4.3. Androgeneza	56
2.4.4. Kultura protoplasta	59
3. PRIMENA TEHNIKA <i>IN VITRO</i> ZA KRIOPREZERVACIJU GERMPLAZME DRVEĆA	61
3.1. Potreba za kulturom <i>in vitro</i>	64

4. PRIMENA SOMATSKJE EMBRIOGENEZE I KRIOPREZERVACIJE DRVENASTIH VRSTA ZA POTREBE KLONSKOG ŠUMARSTVA	66
4.1. Primena somatskih embriona u proizvodnji sintetičkog semena šumskog drveća	68
5. SEKUNDARNI (SM) METABOLITI ŠUMSKOG DRVEĆA	68
5.1. Biološka funkcija sekundarnih metabolita	69
5.1.1. Alkaloidi	70
5.1.2. Terpeni	75
5.1.3. Fenolna jedinjenja	76
5.1.4. Heterozidi, glukozidi i glikozidi	77
5.1.5. Proizvodnja sekundarnih metabolita u biljnom tkivu gajenog u kulturi <i>in vitro</i>	78
6. GENETIČKA TRANSFORMACIJA ŠUMSKOG DRVEĆA	80
6.1. Mogućnosti i ograničenja oplemenjivanja šumskog drveća	83
6.2. Primena tehnike transfera gena i genetičkih modifikacija u šumarstvu	83
6.2.1. Genetička transformacija divljeg kestena (<i>Aesculus hippocastanum L.</i>)	85
7. ZAKLJUČCI I PREDLOZI	87
LITERATURA	89

2. POGLAVLJE

SOMATSKA EMBRIOGENEZA LESKE (*Corylus avellana L.*) 106

1. UVOD	107
1.1. Morfologija roda <i>Corylus</i>	107
1.2. Geografsko rasprostranjenje i najvažnija područja uzgajanja leske	110
1.3. Privredni značaj, proizvodnja i plantažiranje leske	113
1.3.1. Perspektive gajenja leske u Srbiji	116
1.4. Bolesti kod leske	121
1.5. Klasično vegetativno razmnožavanje i poboljšavanje	123
2. <i>IN VITRO</i> RAZMNOŽAVANJE	124
2.1. Metode sterilizacije biljnih eksplantata	125
2.2. Sastav hranljivih podloga za kulturu meristema, vršnih pupoljaka i segmenata stabla	127
2.3. Umnožavanje i izduživanje izdanaka	128
2.4. Ožiljavanje i formiranje biljčica	133
3. FIZIOLOŠKA ISTRAŽIVANJA KOJA SE ODOSE NA <i>IN VITRO</i> I <i>IN VIVO</i> REJUVENILIZACIJU	135

3.1. Poliamini kao indikatori razvića	135
3.2. Poliamini kao indikatori promene faza i rejuvenilizacije	137
4. SOMATSKA EMBRIOGENEZA	138
4.1. Hranljive podloge za uspostavljanje kultura	140
4.1.1. Direktna somatska embriogeneza	140
4.1.2. Indirektna somatska embriogeneza	141
4.1.3. Organogeneza	144
4.1.4. Poreklo somatskih embriona	146
4.1.5. Održavanje procesa somatske embriogeneze u kulturi <i>in vitro</i>	147
4.1.6. Klijanje somatskih embriona i formiranje biljčica	148
4.1.7. Sazrevanje somatskih embriona	149
4.1.8. Uticaj niske temperature na klijanje somatskih embriona	151
4.1.9. Uticaj različitih šećera i polietilenglikola (PEG) na klijanje somatskih embriona	152
4.1.10. Faza aklimatizacije " <i>in vitro</i> " biljčica leske i gajenje u uslovima polja	153
5. MORFO-HISTOLOŠKA I CITOLOŠKA ISTRAŽIVANJA SOMATSKE EMBRIOGENEZE	154
5.1. Anatomska istraživanja embriogenog kalusa i somatske embriogeneze	154
5.2. Histološka istraživanja somatske embriogeneze	157
5.3. Fina struktura embriogenog kalusa	165
5.4. Uticaj analoga nekih baza nukleinskih kiselina i inhibitora sinteze proteina na promenu ultrastrukture granularanog endoplazmatičnog retikuluma (RER)	175
6. BIOHEMIJSKA I MOLEKULARNA ISTRAŽIVANJA SOMATSKE EMBRIOGENEZE	178
6.1. Endogeni biljni regulatori rastinja i embriogeni kapacitet biljnih ćelija	179
6.1.1. Analitičke metode	179
6.1.2. Odnos između endogenih regulatora rastinja i embriogenog kapaciteta eksplantata	180
6.1.3. Sposobnost specifičnih polipeptida u somatskoj embriogenezi	186
6.1.4. Izoenzimi i embriogena aktivnost	187
7. IZOLACIJA I KULTURA PROTOPLASTA LESKE	188
7.1. Dokaz za novo sintetisanu dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) u kulturi <i>in vitro</i> protoplasta leske	190
8. KRIOPREZERVACIJA	191
9. ZAKLJUČCI I PREDLOZI	193
LITERATURA	194

3. POGLAVLJE

SOMATSKA EMBRIOGENEZA PAULOVNIE (<i>Paulownia tomentosa</i> Steud.)	208
1. UVOD	209
1.1. Morfologija roda <i>Paulownia</i>	209
1.2. Ekološko stanište	210
1.3. Geografsko rasprostranjenje, poreklo, razmnožavanje i najvažnija područja uzgajanja	211
1.3.1. Uticaj teške vode (D ₂ O) na klijanje fotosenzitivnih semena <i>Paulownia tomentosa</i>	212
1.4. Privredni značaj i plantažiranje paulovnie	213
1.4.1. Plantažiranje paulovnie i upravljanje emisijom štetnih gasova	218
1.5. Opcije menadžmenta	219
1.6. Bolesti kod paulovnie	220
2. SOMATSKA EMBRIOGENEZA	223
2.1. Metode površnske sterilizacije i izolacija eksplantata	223
2.2. Hranljive podloge za indukciju i formiranje embriogenih kalusa	224
2.3. Indukcija somatskih embriona i formiranje biljčica	224
3. MORFO-HISTOLOŠKA I CITOLOŠKA ISTRAŽIVANJA SOMATSKE EMBRIOGENEZE	230
3.1. Anatomska istraživanja embriogenog kalusa i somatske embriogeneze	230
3.2. Histološka istraživanja somatske embriogeneze	232
3.3. Ultrastrukturna istraživanja embriogenog kalusa	233
4. ORGANOGENEZA	236
4.1. Ožiljavanje izduženih izdanaka i formiranje biljčica	238
4.2. Uticaj magnetnog polja na regeneraciju biljaka u kulturi <i>in vitro</i>	240
4.3. Uticaj metoda propagacije na stepen preživljavanja i rast u <i>ex vitro</i> uslovima kod različitih vrsta paulovnie	241
5. SINTETIČKA SEMENA	243
6. SEKUNDARNI METABOLITI	244
7. GENETIČKA TRANSFORMACIJA	245
8. ZAKLJUČCI I PREDLOZI	245
LITERATURA	247

O AUTORU	255

3.2. Poliamini kao indikatori promene faza i rejuvenilizacije

Proučavana je koncentracija endogenih poliamina u listovima sa juvenilnih i zrelih izdanaka leske, kao i u listovima sa izdanaka dobijenih forsiranim rastom i mikropropagacijom adultnog tkiva (Rey et al., 1994c). Da bi se odredilo da li je posmatrana *in vitro* rejuvenilizacija u vezi sa metabolizmom poliamina, testiran je uticaj sukcesivnih, uzastopnih prenošenja (subkultura) na koncentracije poliamina. Poliamini, pre svega slobodni **Put**, imali su više vrednosti u juvenilnim tkivima. Adultna tkiva koja su razmnožavana mikropropagacijom, posle 14-e subkulture imala su koncentracije poliamina svojstvene juvenilnim tkivima. Međutim, posle nekoliko dodatnih prenošenja, ukupne koncentracije poliamina su opale. Odnos **Put** prema **Spd** i **Spm** bio je viši u juvenilnim tkivima i tkivima iz mikropropagacije nego u adultnim tkivima, ali se smanjivao posle 20–og pasaža u tkivima iz mikropropagacije. Ovaj odnos možda održava ravnotežu između vegetativnog rasta i reproduktivnih procesa. Na taj način analiza koncentracija poliamina može da obezbedi jednostavan test za određivanje juvenilnosti biljnih tkiva, a time i njihovu pogodnost za mikropropagaciju. Dejstvo *in vivo* rejuvenilizacije analizirano je u odnosu na sadržaj endogenih poliamina (Rey et al., 1994b) u listovima i pupoljcima odraslih stabala leske i onih stabala koja su više puta orezivana. Takođe, je određivan i sadržaj poliamina u listovima iz izdanaka dobijenih forsiranim rastom grana uzetih sa odraslih i orezivanih stabala. Variacije nivoa poliamina u odnosu na tretmane orezivanja zapažene su u svim analiziranim tkivima. Nivo slobodnih poliamina je rastao kao odgovor na tretman orezivanja, najvećim delom kroz povećanje slobodnog **Put**. Slobodni **Spd** i **Spm** su se smanjivali sa intenzitetom orezivanja, dok vezani poliamini izgleda da nisu bili u korelaciji sa bilo kojim tretmanom. Značajno je da je odnos **Put** prema **Spd** i **Spm** u svim tkivima rastao u slobodnoj frakciji. Rezultati pokazuju da bi metabolizam poliamina mogao igrati važnu ulogu kao fiziološki marker za juvenilnost i rejuvenilizaciju kod kloniranih drvenastih biljaka.

Takođe, je proučavano dejstvo ponovljenog obilnog orezivanja na sadržaj endogenih slobodnih poliamina u listovima i pupoljcima odraslih biljaka cv. "Negretta" (Rey et al., 1994 b,c). Nivo poliamina se menjao u odnosu na intezitet orezivanja, ukazujući tako na odvijanje pojave rejuvenilizacije. Odnos **Put** prema **Spd** i **Spm** je značajno bio u porastu u odnosu na orezivanje, što potkrepljuje gledište da dinamika metabolizma poliamina, više nego pojedinačne koncentracije bilo koga od njih, učestvuje u kontroli biljne ontogeneze i kasnije ekspresije

morfogenetskog potencijala. Razlike koje su se pojavile u pogledu poliamina između cv. "Negretta" i drugih sorata lešnika, kao što je cv. "Gironell", mogu se dovesti u vezu sa njihovim različitim morfogenetskim potencijalom. Ovo bi moglo ukazivati na to da razlike u genotipovima utiču kako na biosintezu i metabolizam poliamina, tako i na ekspresiju morfogeneze, imajući u vidu i genetičku složenost ovih procesa.

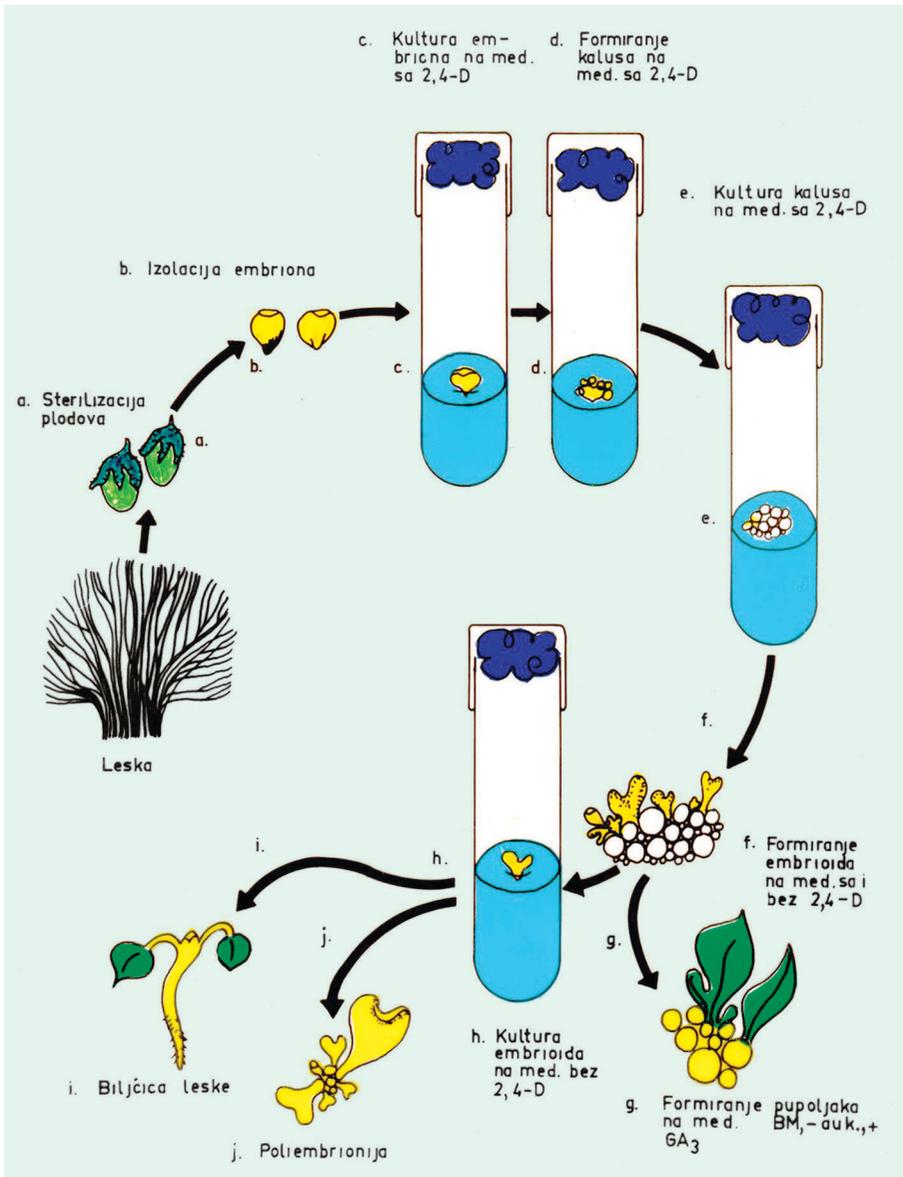
4. SOMATSKA EMBRIOGENEZA

Indukcija somatske embriogeneze (SEm) je proučavana na velikom broju različitog biljnog materijala, uključujući vegetativna i reproduktivna tkiva leske, kao što su **a**) embrionalna tkiva: endosperm, nezreli i zreli zigotski embrioni, kotiledoni i delovi karpela; **b**) juvenilna tkiva: segmenti kotiledona ili segmenti kotiledona sa nodusom, vrhovi izdanka i celi klijanci, kao i **c**) zrela tkiva: listovi i vršni pupoljci izolovani iz *in vitro* izdanaka dobijenih mikropropagacijom zrelih tkiva.

Najbolji rezultati su postignuti sa nezrelim zigotskim embrionima (Sl. 10. a-i). Ovaj put morfogeneze *in vitro* kod leske (Sl. 10. a-i) je razvijen i usavršen kao posledica višegodišnjih istraživanja od strane istraživača na Biološkom Fakultetu u Beogradu (Radojević i sar. 1975; 1983; Radojević, 1977) i kasnije od istraživača sa Univerziteta u Oviedu (Rodriguez i sar. 1985; 1989). Proučavano je nekoliko alternativa za indukciju somatske embriogeneze (SEm), polazeći od različitih inicijalnih eksplantata koji su gajeni u kulturi *in vitro*.

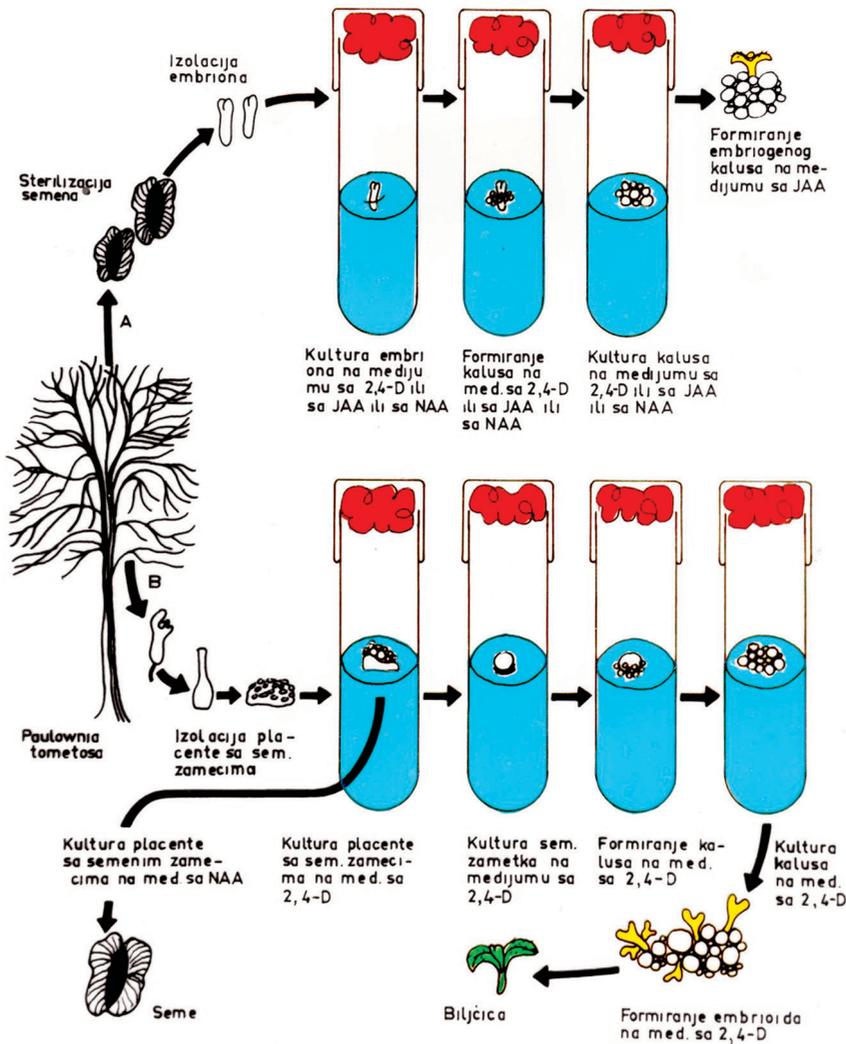
Kada su nezreli zigotski embrioni (ZE), nezavisno od stepena zrelosti, bili inicijalni eksplantati za indukciju embriogenog kalusa (EK), posle sterilizacije semena pristupilo se izolaciji i inokulaciji celih ZE-a prema metodi (Radojević et al., 1975). Kod drugih tipova eksplantata, (pojedinih delova zigotskih ili somatskih embriona), može se koristiti bilo koja od opisanih metoda sterilizacije (vidi odeljak 2.1).

Somatska embriogeneza leske je prvi put indukovana u kulturi nezrelih, zigotskih embriona (Radojević et al., 1975), a nešto kasnije SEm-a je prikazana u kulturi zigotskih embriona, odnosno iz eksplantata embrionalne ose ili eksplantata kotiledona nezrelih embriona (Rodriguez et al., 1985; 1989; Berros, 1996), korišćenjem podloga sa nekoliko kombinacija regulatora rasta. Utvrđene su tri glavne alternative, odnosno tri protokola za indukciju SEm-e i regeneraciju biljčica lešnika iz somatskih embriona. U kulturi eksplantata kotiledona sa nodusom,

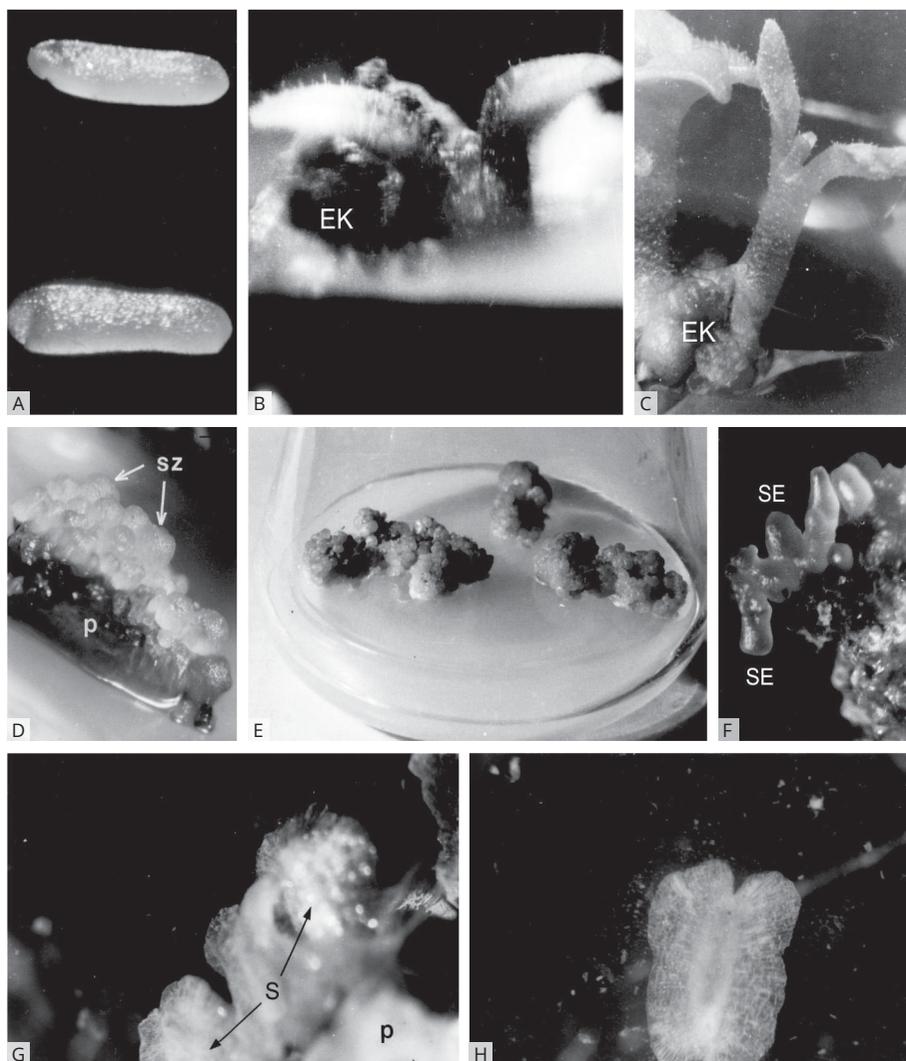


Sl. 10. a-i. Morfogenetski odgovori i formiranje somatskih embriona i biljčica u kulturi nezrelih zigotskih embriona *Corylus avellana* L.: a. Sterilizacija plodova; b. Embrioni leske posle izolacije; c-d. Izolovani zigotski embrioni i gajeni na MS hranljivoj podlozi +2,4-D + Kinetin (1 mg L^{-1} , svaki); e. Formiranje kalusa na istoj MS podlozi; f. Formiranje embriogenog kalusa (EK) i somatskih embriona (SE) na MS podlozi bez hormona i/ili sa 2,4-D $1; 0,1; 0,01; 0,001 \text{ mg L}^{-1}$; g. Formiranje adventivnih pupoljaka (AP) na MS podlozi sa GA₃ 1 mg L^{-1} ; h. Kultura embrioida na MS medijumu bez 2,4-D; i-j. Multiplikacija SE-a na MS podlozi bez 2,4-D (j) i formiranje "In vitro" biljčice leske na MS podlozi + GA₃ 1 mg L^{-1} (i); (Radojević, 1977; crtež J. Radojević).

crnih stroma (veličine 3 mm) u kojima se kasnije obrazuju i pseudotecije. *B. obtusa* prezimljava u vidu zrelih ili delimično zrelih piknidija i pseudotecija u rak ranama na izumrlim granama. Konidije i akospore se oslobađaju tokom celog vegetacionog perioda, ali najintezivnije u proleće. Oslobađanje spora je favorizovano visokom relativnom vlažnošću vazduha i niskom stabilnom temperaturom. Optimalna temperatura za ostvarivanje infekcije je 20 °C.



Sl. 5. Shematski prikaz kulture *in vitro* nezrelih, zigotskih embriona (put A) i kulturu semenih zametaka (Put B) *Paulownia tomentosa* Steud., (crtež A. Radojević, 1977).



Sl.7. A-H. Uticaj različitih auksina (2,4-D; IAA) i kinetina (Kin) na indukciju somatske embriogeneze, formiranje embriogenih kalusa, somatskih embriona i njihovo dalje razviće u biljčice poreklom iz kultura *in vitro* zigotskih embriona i semenih zametaka *Paulownia tormentosa* Steud. A. Nezreli zigotski embrioni u inicijalnoj fazi kulture na MS hranljivoj podlozi sa IAA + Kin. (1 mg L^{-1} , svaki, x 16); B.-C. Embriogeni kalus (EK) sa biljčicama na istom MS medijumu (x 6); D. Kultura placente (p) sa semenim zametcima (sz) na MS podlozi sa 2,4-D + Kin. (1 mg L^{-1} , svaki) posle mesec dana u kulturi (x 14); E. Embriogeni kalus koji je formiran proliferacijom ovula na MS podlozi sa 2,4-D (1 mg L^{-1}), (x 1.3); F. Detalj somatskih embriona (SE) u različitom stadijumu razvića na istoj MS podlozi kao za inicijalno uspostavljanje eksplantata u kulturi (x 14); G. Kultura placente (P) sa novoformiranim semenima (S) u kulturi *in vitro* na Miller-ovom mineralnom rastvoru + NAA + Kin. (1 mg L^{-1} , svaki), (x 14) i H. Seme sa razvijenim krilcima posle izdvajanja sa placente koje je završilo svoje razviće posle tri meseca gajenja na prethodnoj podlozi u kulturi *in vitro*, (x 14); (Radojević, 1977; 1979).