

Indukcija kalusa iz vršnog meristema izdanka pšenice

Kajan, Karolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:671622>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Karolina Kajan

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Indukcija kalusa iz vršnog meristema izdanka pšenice

Završni rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Karolina Kajan

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Indukcija kalusa iz vršnog meristema izdanka pšenice

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. prof.dr.sc. Sonja Vila, član
3. doc.dr.sc. Monika Tkalec Kojić, član

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Hortikultura
Karolina Kajan

Završni rad

Indukcija kalusa iz vršnog meristema izdanka pšenice

Sadržaj: Pšenica je najznačajnija zrnata žitarica za prehranu. U ovom radu se na hranjivu podlogu postavljala zrna pšenice, 5-7 dana nakon što je narastao izdanak se rezao vršni meristem i ponovno postavio na hranjivu podlogu. Glavni cilj je istražiti je li moguća indukcija kalusa i u kojem postotku. Rast i razvoj kalusa se pokazao uspješnim uz pomoć sterilnih uvjeta rada i dobru hranjivu podlogu. Svrha ovoga rada je optimizirati genotip na stresne uvjete abiotičkog i biotičkog podrijetla.

Ključne riječi: pšenica, indukcija, kalus, vršni meristem

21 stranica, 2 tablice, 13 slika, 20 literaturnih navoda, 0 grafikona

Završni rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study of Agrobitechnical sciences, course Horticulture
Karolina Kajan

BSc Thesis

Height span of wheat (*Triticum sp.*) varieties recognized in the period from 1930. to 2018.

Callus induction from the apical meristem of wheat shoots

Summary: Wheat is the most significant grain used for nutrition. Firstly, wheat seeds were layed on a medium, after 5-7 days when the wheat shoot grew, apical meristem was cut and equally layed on a medium. The main purpose was to examine the germination quality and quantity. Callus growth and development was proven to be successful in sterile conditions and good medium. The main aim of the thesis is to optimize the genotype to the stressful effects of abiotic and biotic conditions.

Keywords: wheat, induction, callus, apical meristem

21 pages, 2 tables, 13 figures, 20 references, 0 charts

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. MATERIJAL I METODE	
2.1. Biljni materijal	3
2.2. Laboratorijska oprema i kemikalije.....	3
2.3. Priprema biljnog materijala i stavljanje na hranjivu podlogu.....	6
2.4. Izdvajanje vršnog meristema	8
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	11
4. ZAKLJUČAK.....	19
5. POPIS LITERATURE	20

1. UVOD

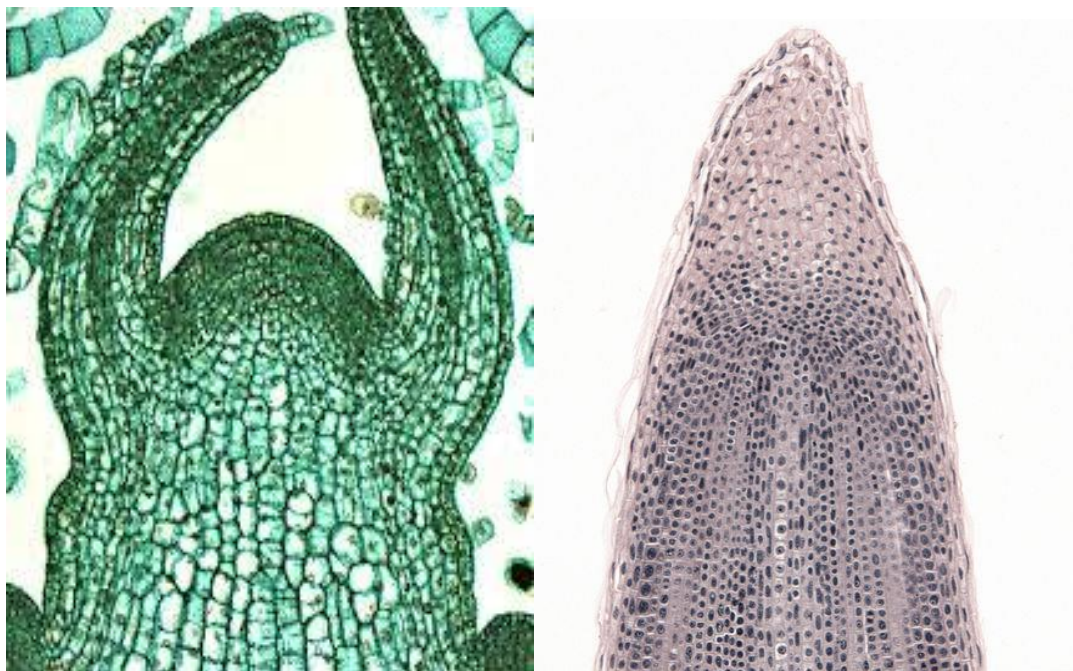
In vitro istraživanja su sve češća u znanstvenom svijetu te se danas u sterilnim uvjetima razvijaju kulture embrija, vegetacijskih izdanaka, meristema, tkiva, stanica i protoplasta iz kojih se regeneriraju jedinke mnogih biljnih vrsta. Ovaj postupak postaje sve djelotvorniji u dobivanju zdravih biljaka oslobođenih od virusa iz prethodno zaraženih (Jelaska, 1994.). Osnova ideje multipliciranja biljnih dijelova proizlazi iz činjenice da su pojedinačne stanice totipotentne. Naime, mnoge biljne stanice su sposobne formirati bilo koji drugi tip stanica ili tkiva, koji su na kraju potrebni za regeneraciju cijele biljke. Pravilnim odabirom te udjelom hranjivih tvari i regulatora rasta, nediferencirane biljne stanice u kulturi mogu biti inducirane na formiranje različitih biljnih tkiva, uključujući i korijen, stabljiku i listove. Navedena metoda privukla je značajnu pažnju jer omogućava sredstvo proučavanja fiziologije bilja, genetske procese i povrh toga pomaže u oplemenjivanju poboljšanih kultivara s povećanom genetskom varijabilnošću (Benderradiji i sur., 2011.).

Tijekom fizičke ozljede, biljke formiraju kalus koji je pod genetskom regulacijom. Indukcija kalusa pokreće varijacije u endogenim razinama biljnih hormona koje se javljaju kao odgovor na fizičke ili kemijske podražaje. Postoji nekoliko regulatornih puteva koje vode do staničnog reprogramiranja, uključujući put na bazi citokinina, auksina i putem rane. Stanično reprogramiranje uzrokovano ranom može nastati zbog bakterijskih, virusnih i/ili napadom insekta (Tuskan i sur., 2018.). Molekularno razumijevanje ovog procesa je osnova za daljnji uspješni razvoj različitih kultura te samim time uvođenje genetskih elemenata u eksperimentalne i industrijske pogone.

Lokalizirano rastuće tkivo, koje ostaje embrionalno tijekom cijelog vegetacijskog razdoblja se sastoji od zrelog i nezrelog tkiva. Dijelove biljke s tim embrionalnim tkivom nazivamo meristemom. Meristemsko tkivo trajno zadržava sposobnost stvaranja novih stanica. Može se klasificirati prema podrijetlu. Meristem kojemu su stanice direktno nastale iz embrionalnih stanica naziva se primarnim meristemom, a meristem nastao iz diferenciranih stanica, ali je nastavio meristemsku aktivnost naziva se sekundarni meristem.

Meristem se također klasificira prema položaju u tijelu biljke. Bočni meristemi ili kambij su meristemi raspoređeni paralelno s bočnim stranama stabljike i korijena tj. omogućavaju biljci rast i u širinu. Zatim, drugi pojam zasnovan na položaju meristema je interkalarni meristem. Ovaj meristem se odnosi na meristemsko tkivo nastalo iz apikalnog meristema tj. podrazumijeva

se da je položaj toga meristema između tkiva koja više nemaju sposobnost dijeljenja stanica. Apikalni ili vršni meristemi, oni koji su smješteni na vrhovima glavnih i bočnih izdanaka i korijenu (Slika 1.). Takva tkiva diferenciranjem stvorenih stanica produljuju dijelove biljke na kojima se nalaze u dubinu i visinu, što nazivamo primarnim rastom (Denffer, Ziegler, 1988.).



Slika 1. Vršni meristemi izdanka i korijena

(Izvor internetske stranice: <https://www.siyavula.com/read/science/>)

Cilj istraživanja je ispitati uspješnost *in vitro* razvoja kalusa iz vršnog meristema izdanka pšenice.

2. MATERIJAL I METODE

2.1 Biljni materijal

Među genotipovima pšenice, različiti se eksplantanti koriste za formiranje embriogenog kalusa i regeneraciju biljke: zreli i nezreli embrij, cvat, koleoptil, vršni meristem i prašnici te se razlikuju po svojstvu regeneracije od cijele biljke (Benderradji i sur., 2011.).

Istraživanje je provedeno na dva heksaploidna genotipa pšenice, Srpanjka i Super Žitarka. Srpanjka je najraširenija sorta u proizvodnji u Hrvatskoj. Vrlo dobre je otpornosti prema polijeganju, rana, niska, moderna, stabilna, visokorodna i kvalitetna sorta. Genetski potencijal rodnoći veći je od 10t/ha, spada u kvalitetnu grupu B1 i u 2. razred kakvoće. Tolerantna je prema niskim temperaturama i brzo se oporavlja nakon zime, prema rasprostranjenim bolestima ozime pšenice. Visoke i stabilne urode zrna ostvaruje temeljem velikog broja rodni klasova po jedinici površine. Optimalni rok sjetve je od 10. do 25. listopada s 650 – 700 klijavih zrna/m² (<https://www.poljinos.hr/>). 2019. godine je klasala 1.5. te cvjetala 11.5.

Sorta Super Žitarka srednje je rana, ozima pšenica. Visoko rodna i kvalitetna sorta. Genetski potencijal rodnoći veći je od 10t/ha, spada u kvalitetnu grupu B1 te 1. – 2. razred kakvoće. Tolerantna je na rasprostranjene bolesti ozime pšenice, po tolerantnosti na polijeganje slična je sorti Žitarka. Posjeduje i vrlo dobru otpornost osipanju zrna u klasu. Ima izraženu dormantnost sjemena. Optimalni rok sjetve je od 7. do 20. listopada s 650 – 700 klijavih zrna/m² (<https://www.poljinos.hr/>). Godine 2019. sorta Super Žitarka je klasala 5.5. te cvjetala 15.5

Odabir sorata se temeljio na ranozrelim sortama koje su klasale početkom svibnja. Klasovi obje sorte su prikupljeni na polju kada je sjeme bilo u kasnoj fazi voštane zriobe. Nastavak pokusa se odvijao u Laboratoriju za biljnu genetiku i biotehnologiju te u Laboratoriju za *in vitro* umnažanje biljaka Fakulteta agrobiotehničkih znanosti.

2.2 Laboratorijska oprema i kemikalije

Sastavni dijelovi svake hranjive podloge su voda, agar, šećer, regulatori, anorganska hraniva i pH. Zbog velikog udjela vode u mediju, važno je obratiti pažnju na kvalitetu vode. Preporučena je Pyrexglass destilirana voda, a za istraživanja koja uključuju protoplaste, stanice i meristem dvostruko destilirana. Nakon vode slijedi agar. Agar je derivat morskih algi dobiven u obliku peleta. To je polisaharid s velikom molekularnom masom te se koristi se kao agent kojim

dobivamo želatinoznu konzistenciju medija. Najčešće se koristi Difco Bacto agar koncentracije 0,6-0,8%. Nadalje slijede ugljikohidrati, preciznije šećer. Bez šećera je fotosinteza nedostatna, s njom i rast i razvoj biljke. Koncentracija od 1-5% saharoze je inače korištena u *in vitro* uzgoju. Biljka saharozu prirodno sintetizira i prenosi, također se koriste i glukoza i fruktoza. Koncentracija šećera se odabire s obzirom na tip i dob biljnog materijala.

Slijede regulatori, prirodno sintetizirani organski spojevi koji utječu na rast i razvitak biljke. Regulatori auksin i citokinin su neophodni, koncentracija im je ovisna o uzorku. U praksi se najčešće upotrebljava 2,4-D regulator .

Slijedeći sastavni dio hranjive podloge su vitamini. Većina biljaka je sposobna sama sintetizirati vitamin te je upitan čin ubacivanja vitamina u sastav hranjive podloge. Najčešće se koriste inozitol, vitamin B1, folna kiselina ili tiamin. Anorganska hraniva sastoje se od mineralnih soli koje u većini kultura zadovoljavaju potrebe za makroelementima i mikroelementima. Znanje o utjecaju pH reakcije na razvoj biljke *in vitro*, no predočeno je da raspon od 5,0-6,5 pogodan. Generalno rečeno poznato nam je da ekstremi odnosno minimum od 4,5 i maksimum iznad 7,0 zaustavljaju daljnji razvoj bilje (Pierik, 1987.).

Eksplantati biljaka uzgajaju se u uvjetima *in vitro* na umjetnim hranidbenim podlogama. Uspješnost kulture stanica, tkiva ili organa ovisit će o izboru pogodnoga sastava hranidbene podloge. Ovome radu će poslužiti hranjiva podloga bazirana na MS medij Musharige T. i Skoof F. 1962 (Applied Biotechnology Center, 1999.) (Tablica 1.).

Tablica 1. Sastav hranjive podloge za klijanje i indukciju kalusa

Sastav (mjerna jedinica)	500 mL	1000 mL	2000 mL	3000 mL
MS makroelementi (10x) (mL)	100	200	400	600
MS mikroelementi (10x) (mL)	50	100	200	300
MS vitamini (1000x) (mL)	0,5	1	2 ml	3
Tiamin Cl (mg)	0,020	0,040	0,080	0,120
L-Asparagin (g)	0,075	0,150	0,300	0,450
Sukroza (g)	30	60	120	180
2,4 D (ml)	1,75	2,5	5,0 ml	7,5
Agar (g)	4	8	16	24

Priprema hranidbene podloge zahtjeva vrlo čisto posuđe, vodu visoke čistoće, kemijske tvari visoke kakvoće i pažljivo mjerenje svih komponenti podloge (Jelaska, 1994.).

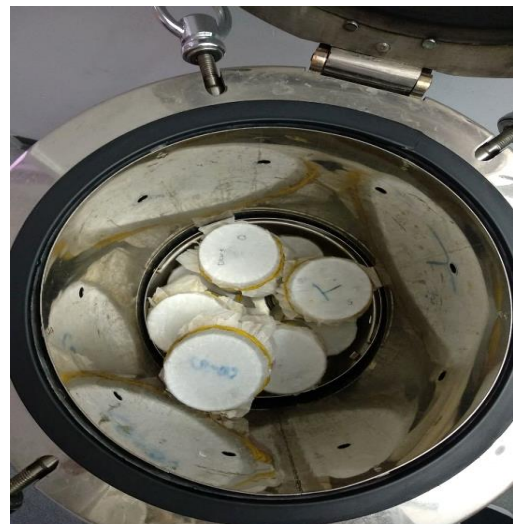
Obavezna laboratorijska oprema za pripremu hranjive podloge je vaga za mjerenje tvari u gramima, precizna vaga za mjerenje u miligramima, pH-metar, epruvete, tikvice, bočice, uređaj za sterilizaciju vrućom parom i povišenim tlakom (autoklav) i prostor za čuvanje pripremljene hranidbene podloge, sterilne vode i sl.

Za hranjivu podlogu bilo je potrebno pripremiti 500 mL deionizirane vode koja je ulivena u čašu od 2000 mL, zatim je dodano 200 mL MS makroelemenata, 100 mL mikroelemenata, 1 mL MS vitamina, 1,040 g tiamin-CL, 0,150 g asparagina, 60 g sukroze te se dobro promiješa. Nakon toga 2,5 mL 2,4-D iz radne otopine – 10 mg 2,4-D potpuno otopljeno u 1 mL 1 M NaOH i dodano je 9 mL deionizirane vode i sve zajedno izmiješano na magnetskoj miješalici. Zatim je sve uliveno u menzuru od 1 L i dopunjeno s deioniziranom vodom do 1000 mL. pH otopine je prilagođen na 5,7 s 1 M NaOH.

Otopina od 1000 mL E3 medija je podijeljena u dvije čaše od 1000 mL, svaka je sadržavala 500 mL, u nju je dodano 4 g Bacto-agara u obje čaše. Nakon toga su čaše pokrivene s čepom i folijom i stavljene u autoklav na 121°C na 15 minuta, 15 psi (slika 2 i 3).



Slika 2. Autoklav



Slika 3. Sterilizacija hranjivih podloga.

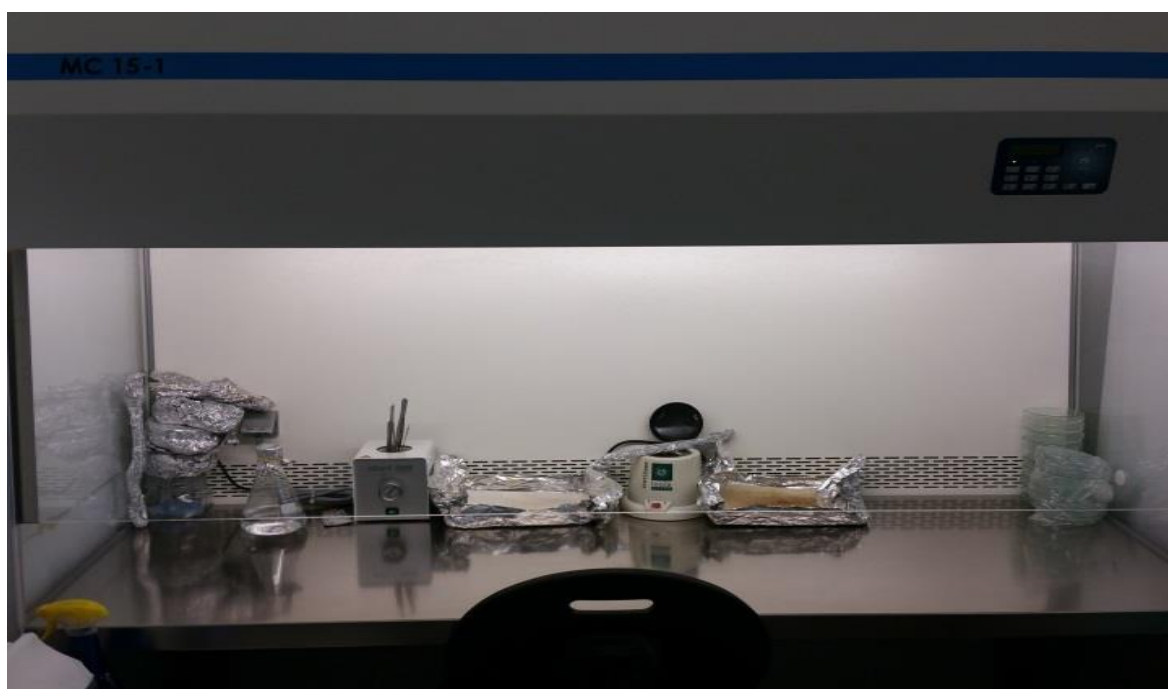
(foto original: Kajan K.)

Nakon autoklaviranja čaše su stavljene u vodenu kupku 50°C kako bi se ohladile. Svaki medij od 500 mL je bio dovoljan za 20 (100x15 mm) Petrijevih zdjelica ili 40 (60x15 mm) Petrijevih zdjelica.

2.3 Priprema biljnog materijala i postavljanje na hranjivu podlogu

Sterilni uvjeti su ključan dio istraživanja. Oni uključuju zaštitnu kutu i rukavice te dobro oprane ruke, tijelo i kosa su primarni koraci. Čišćenje površina je obavljeno 96% alkoholom, a svi potrebni instrumenti sterilizirani na temperaturi od 250°C. Iako se priprema i rezanje eksplantanata odvija na sterilnoj staklenoj zdjelici ili na sterilnom filter papiru, obavezno je ove zadatke izvesti u sterilnom kabinetu tj. laminaru („air flow cabinet“) (Slika 4.). Rad izvan laminara predstavlja prevelik rizik, mogućnost infekcije se povećava za čak 10%.

Metoda pripreme i sterilizacije zrna preuzeta je iz (Mahmood i Razzaq, 2017.)



Slika 4. Laminar

(foto original: Kajan K.)

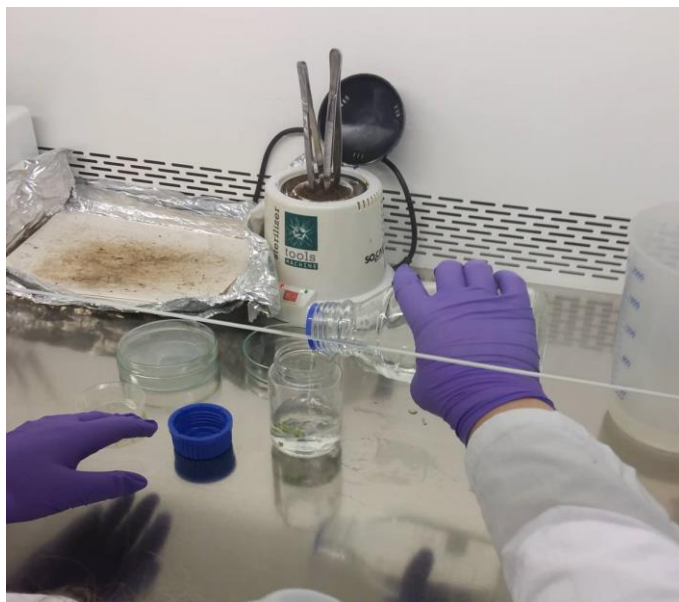
Odabrano je po 20 zrna oba genotipa, deset po svakom genotipu. Zrna su sterilizirana prvo s 90% etanolom, u kojemu su stajali 5 minuta. Zatim sa 6,5% otopinom natrijevog hipoklorita, koja je sadržala 0,1% Tween-20. Nakon stavljanja zrna su u čašu s otopinom za sterilizaciju, uzorci su stavljeni na magnetsku miješalicu u trajanju od 30 minuta (Slika 5.). Nakon 30 minuta, zrna su isprana 4 puta po 5 minuta destiliranom autoklaviranom vodom u laminaru (Slika 6.). Tijekom ispiranja, pripremljene su Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom, sterilna pinceta i parafilm. Na hranjivu podlogu jedne Petrijeve zdjelice položeno je 10 sterilnih zrna s brazdicom

okrenutom prema gore, drugih 10 je položeno brazdicom okrenutom prema hranjivoj podlozi, postupak je primijenjeno je za oba genotipa pšenice (Slika 7.).



Slika 5. Sterilizacija zrna

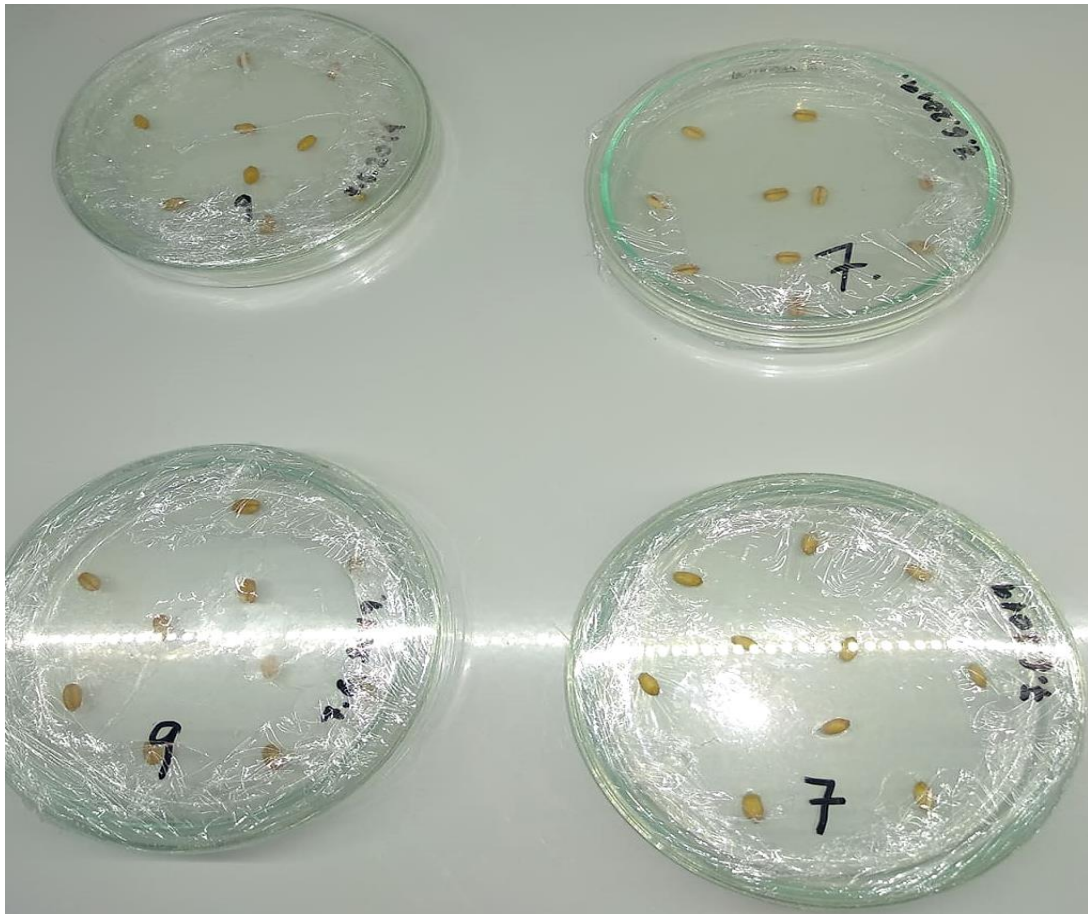
(foto original: Kajan K.)



Slika 6. Ispiranje zrna steriliziranom vodom

(foto original: Kajan K.)

Tijekom klijanja navedenih zrna utvrđena je veća frekvencija klijanja u onih zrna koji su okrenuti brazdicom prema dolje. Petrijeve zdjelice s medijem i zrnima pšenice su stavljene pod obično svjetlo, na temperaturu i tlak pri standardnim uvjetima. Prema Benderradji (2012.) navodi kako se nakon zatvaranja uzorka, postavlja svjetlo po potrebi genotipa. Uzorci spomenutnog rada su stavljani u prostoriju s fotoperiodom od 16 sati svjetla i 8 sati tame, a temperatura nije bila viša od 25°C.



Slika 7. Zrna na hranjivoj podlozi.

(foto original: Kajan K.)

2.4 Izdvajanje vršnog meristema

Meristem odnosno nakupina stanica čijim djelovanjem nastaju novi organi, nalazi se samo na vrhovima organa, što je razlog zašto ih zovemo još i vršni ili apikalni meristem. Nalaze se u strogo određenom i ograničenom dijelu biljnoga tijela, a to su vegetacijski vrh stabljike i

vegetacijski vrh korijena. U ovome radu se vršni meristem uzimao iz vegetacijskog vrha stabljike. Izdvajanje vršnog meristema se smatra jednim od težih dijelova eksperimenta. Odvija se nakon pojave posve vidljivih izdanaka, 3-7 dana od postavljanja zrna na hranjivu podlogu. Izdanci su uspješno isključili bez kontaminacije tj. bez pojave bolesti, bakterija, gljiva. Izdanci s najobećavajućim izdankom se odabrao za vršni meristem.

Pri sterilnim uvjetima u laminaru je postavljena petrijeva zdjelica, zajedno s mikroskopom pripremljenim kako bi se olakšao pronalazak vršnog meristema. Izdank se u sterilnim uvjetima s pincetom i skalpelom secira s namjerom izdvajanja vršnog meristema izdanka, ispod mezokotila. Nekim uzorcima se odvojio koleoptil te se samo mezokotil s vršnim meristemom stavio na hranidbenu podlogu. Uzorci u petrijevim zdjelicama stavljeni su ponovno pod svjetlo u standardnim uvjetima u trajanju od 3 tjedna. Pokušaj izdvajanja vršnog meristema se ponovio i na izdancima starijim od 3 tjedna (Slika 8. i 9.) s namjerom poboljšanja rezultata istraživanja.



Slika 8. Izdanci sorte Srpanjka stari 3 tjedna
(foto original: Bošnjak D.)

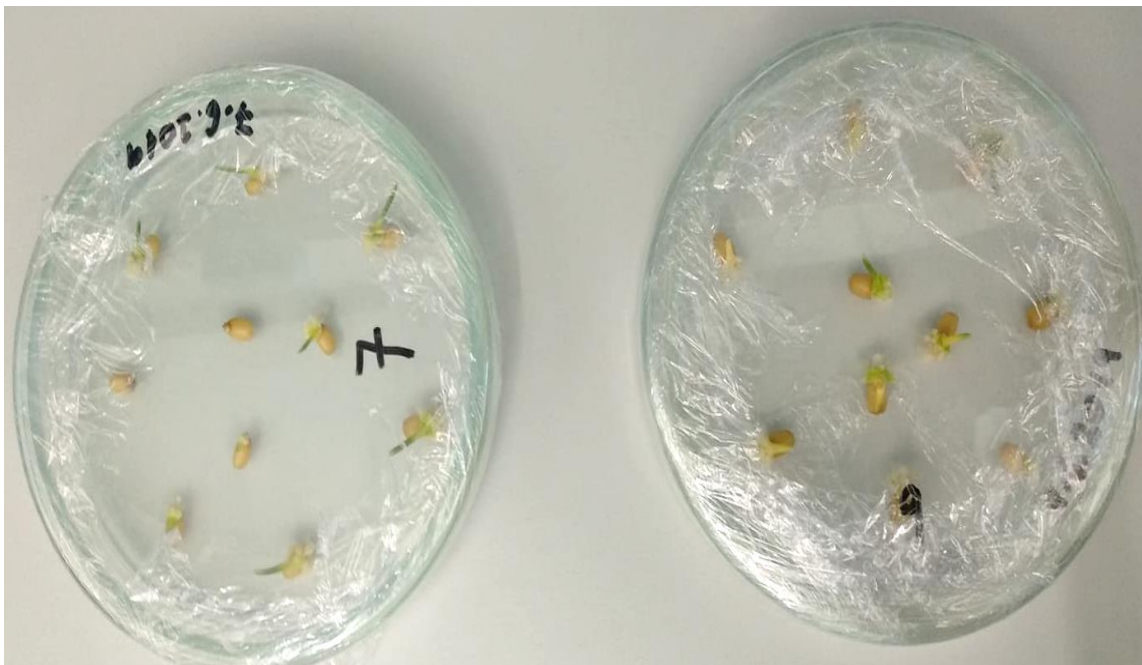


Slika 9. Izdanci sorte Super Žitarka stari 3 tjedna, na lijevoj strani je prikazan genotip
(foto original: Bošnjak D.)

3. REZULTATI I RASPRAVA

Među genotipovima pšenice, različiti se eksplantanti koriste za formiranje embriogenog kalusa i regeneraciju biljke: zreli i nezreli embrij, cvat, koleoptil, vršni meristem i prašnici. Navedena tkiva se razlikuju po svojstvu regeneracije cijele biljke. (Benderradji i sur., 2011.).

Genotipovi korišteni u istraživanju Srpanjka i Super Žitarka. Za obje sorte nakon sedam dana utvrđena je vrlo visoka klijavost 100% u Super Žitarke (Petrijeva zdjelica 9) i 80% u Srpanjke (Petrijeva zdjelica 7) bez pojave bolesti moguće kontaminacije (Slika 9.).



Slika 9. Klijavost Srpanjke (7) i Super Žitarke (9) nakon 7 dana

(foto original: Kajan K.)

Visoki postotak klijavosti je rezultat koji se ogleda u tome što je korišteno mlado zrno koje je na odgovarajući način sterilizirano kako ne bi došlo do bolesti nakon stavljanja na medij. Biljni materijal je moguće sterilizirati prema više različitih protokola, za razliku od protokola kojim su sterilizirani eksplantati u ovome radu, prvo s 90% etanolom, u kojem su stajali 5 minuta. Zatim sa 6,5% otopinom natrijevog hipoklorita, koja je sadržala 0,1% Tween-20 je jedna od najčešćih metoda u protokolima. Prema Ali i sur. (2009.) zrno je sterilizirano pomoću tween-

20 i 70% etanolom 30 sekundi i konačno s 40% natrij hipokloritom 20 minuta praćeno ispiranjem steriliziranom, destiliranom vodom s namjerom da se ukloni višak kemijskih tvari. Nakon sušenja zrna pšenice su postavljena na steriliziranu Murashige i Skoog hranjivu podlogu.

Prva faza izdvajanja meristema u ovom radu uključivala je rezanje i odvajanje izdanka od vanjskog dijela zrna zatim stavljanje na hranjivu podlogu. Uzorci klijanaca obje sorte su izvađeni iz hranidbene podloge i slijedilo je korak rezanja vršnog meristema, odvojen je dio mezokotila s vršnim meristemom, prema Viertel i Hess (1996.). Eksplantati su odvojeni pod mikroskopom uklanjajući prvo zrno, korijen, koleoptil i listove. List koji direktno okružuje vršak je bio skraćen na veličinu od 1-2 mm. Ukupno osam od 10 eksplantata po sorti, su uspješno izdvojeni iz 4 i 10 dana starih izdanaka.

U istraživanju Ahmad i sur. (2001.) se navodi se se obavezno supkultivira tkivo svaka 2 tjedna kako bi se sprječila fenolna oksidacija. Supkultiviranje eksplantanata uključuje presađivanje eksplantanata na nove, sterilne podloge. Pojava fenolne oksidacije ne samo da ograničava indukciju kalusa već i ostavlja letalne posljedice na meristemskom tkivu. U ovome istraživanju nije bilo moguće supkultiviranje zbog relativno kratkog vremena.

Zanemarivanje koraka supkultiviranja rezultiralo je pojavljivanjem smeđe boje oko uzoraka i slabim razvojem kalusa (Slika 10.). Smeđa boja oko uzorka označava fenolnu oksidaciju. Fenol je slabije topljiv u vodi, a dobro se otapa u alkoholu, eteru i benzenu. Međutim, fenol ne ubija samo nepoželjne mikroorganizme – ubija i sve tipove stanica. Fenoli su lako podložni oksidaciji (Amić, 2008).

Od nasađenih osam vršnih meristema (Tablica 2.) sorte Srpanjke (7), uspješno je induciran kalus u njih 50%, dok je u sorte Super Žitarka (9) od osam izdanaka 37,5% je formirao kalus (Slika 11. i 12.).

Stvaranje kalusa iz vršnog meristema ne prikazuje uspjeh pri svakom eksperimentu. Tako su Mahmood i Razzaq (2017.) koristili također dva različita genotipa: GA-2002 i AS-2002, u kojih je zabilježena vrlo niska frekvencija indukcije kalusa vršnog meristema od čak 10,83%. Navode kako je razlog niskoj frekvenciji induciranog kalusa u njihovom istraživanju rezultat korištenja premale koncentracija 2,4-D fitohormona.

Vrlo visoka uspješnost razvitka kalusa iz vršnoga meristema odnosno 100%-na unutar 1 – 2 tjedna utvrđena je u istraživanju Viertel i Hess (1996.). Bez obzira na medij, nije primijećena

velika razlika između izdanaka 4 dana starih i 10 dana starih koji su bili bijele boja, kompaktni i čvorastog izgleda.



Slika 10. Fenolna oksidacija oko eksplantata.

(foto original: Kajan K.)

Izračun postotka za frekvenciju klijavosti i frekvenciju formiranja kalusa odnosno učestalost indukcije kalusa je napravljen prema sljedećim formulama. Broj odabranih sjemenki koje su proizvele kalus se dijeli s brojem kultiviranih sjemenki, dobiveni broj se množi sa 100 kako bi se dobio postotak inducirano kalusa tijekom istraživanja. Također sličnom formulom se računa i postotak klijavosti, broj proklijalih sjemenki se dijeli s brojem korištenih sjemenki u istraživanju. Dobiveni broj množi sa 100 kako bi se saznao točan postotak proklijalih eksplantanata (Iqbal i sur., 2016.).

$$\text{učestalost indukcije kalusa \%} = \frac{\text{broj sjemenki koje proizvode kalus}}{\text{broj kultiviranih sjemenki}} \times 100$$

$$\text{klijavost \%} = \frac{\text{broj sjemenki koje su proklijale}}{\text{broj kultiviranih sjemenki}} \times 100$$

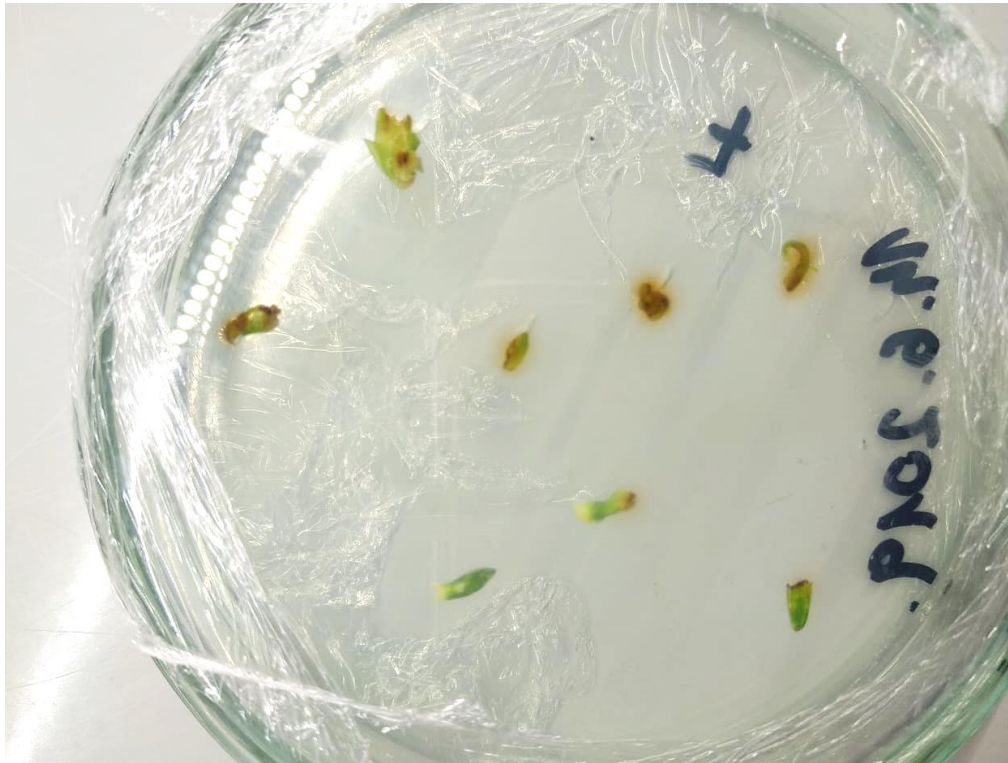
Tablica 2. prikazuje postotke klijavosti i kalusavosti genotipa u istraživanju

Genotip	Klijavost	Kalusavost
Srpanjka	80%	50%
Super Žitarka	100%	37,5%



Slika 11. Inducirani kalusi vršnog meristema Super Žitarke na hranidbenoj podlozi.

(foto original: Kajan K.)



Slika 12. Inducirani kalusi vršnog meristema Srpanjke na hranidbenoj podlozi.
(foto original: Kajan K.)

Razlog dobivenih postotaka prvenstveno može biti uzrok nepovoljnog medija te manjak kompatibilnosti medija i genotipa pšenice, ovakvo svojstvo je fiziološki uvjetovano. Prema Viertel i Hess (1996.) eksplantati su pod utjecajem početnih biljnih materijala, ali i medija i genotipa na kojemu se obavlja istraživanje.

Kao nastavak istraživanja u ovom završnome radu planira se koristiti različite hranjive podloga kako bi utvrdila najpovoljnija za pojedini genotip. Viertel i Hess (1994.) su koristili dva različita tipa podloga, prvi je MSB koji se sastoji od MS soli, B5 vitamina, 3% maltoze, 0,8% agara, s pH od 5,8. Druga ML3 je L3 podloga sličnog sastava, različitog načina pripreme.

U istraživanju Ali i sur. (2009.) korištena su 4 medija s različitim koncentracijama 2,4-D (2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L, 5 mg/L), također je razlika u njima jer jedan u sastavu sadrži još i 0,1 mg/L kinetina. Otkriće ovoga rada je da povećanjem koncentracije 2,4-d iznad 5 mg/L radi veća šteta kalusu. U istraživanju se prvotno povećala koncentracija s 2 na 3 mg/L što je uzrokovalo povećanje kalusa, dok na 2 mg/L se utjecaj nije ni primijetio. Zatim na podlozi s 4 mg/L veličina kalusa nije bila veća od prethodnih, postotak je bio manji. Na podlozi s 5 mg/L 2,4-D je također dodan kinetin koji je omogućio povećanje kalusa.

U istraživanju Tyankova i Zagorska (2000.) navedeno je da je upravo genotip među glavnim organogenetskim činiteljima kalusne kulture.

Nikako nije zanemariva i ljudska pogreška pri rezanju meristema. Takva mogućnost je vjerojatno razlog neuspjeha s uzorcima prikazanim na Slici 13.



Slika 13. Uzorci bez uspješne indukcije kalusa

(foto original: Bošnjak D.)

Kao što je prije u radu navedeno, regulatori su prirodno sintetizirani organski spojevi koji utječu na rast i razvitak biljke, neophodni, koncentracija im je ovisna o uzorku. Prisutnost 2,4-D je od esencijalne važnosti za indukciju i održavanje somatske embriogeneze. Organski dušični aditivi L-proline, L-asparagine i kazein hidrolizat označili su učinak na indukciju kalusa u mediju. Značajan utjecaj je zamijećen pri dodavanju L-asparagina u koncentraciji od 150 mg/L. Uočen je prirast somatske embriogeneze i do 42% korištenjem 150 mg/L L-asparagina za razliku od 2,4-D regulatora. Učinak L-asparagina je nadalje istražen s različitim koncentracijama 2,4-D regulatora te je najviša embriogeneza primjećena pri 2,0 mg/L i najniža pri 1,0 mg/L (Sarker i sur., 2007.).

Regulator rasta auksin ima neophodnu ulogu u indukciji kalusa, ali njegov nepovoljan učinak na regeneraciju smanjuje efikasnost regeneracije izdanka.

Jasdeep i sur., (2019.) napominju kako bi korištenje 2,4-D i NAA kao ishodište auksina, učinkovito za razvoj kalusa i diferencijaciju tkiva u žitarica. Autori su ga koristili ili u kombinaciji s NAA ili s NAA i BAP, te s K. U radu su tako prikazani protokoli za medije različitih koncentracija NAA, 2,4-D i K, te su odabrani oni koji su najbolji za određene genotipove.

Prirodni hormoni su esencijalni za razvoj biljke, citokinini u omjeru s auksinima u hranjivoj podlozi utječu na organogenezu kalusa odnosno usmjerava rast kalusa u formiranje stabljike i korijena (Parađiković, 2014.).

Glavni razlog kontroverznosti je zabuna u pogledima genetske i razvojne biologije na staničnu diferencijaciju. Svaki višestanični organizam je karakteriziran danim brojem gena. Niti jedna stanica ne posjeduje gene koji su svi istovremeno ekspresivni, već samo dio njih što označava genetsku diferencijaciju (Feher, 2019.). Brojna istraživanja gena povezanih s formiranjem kalusa su provedena uz pomoć qRT-PCR analiza no znanje o genima vezanim uz formiranje kalusa je prilično ograničeno posebno u pšenice. Veličina i poliploidna složenost genoma pšenice i poteškoće kulture tkiva su prepreke u daljnjem istraživanju gena povezanih s formiranjem kalusa kod pšenice (Chu i sur., 2017.)

Uspješnost kulture tkiva se može provjeriti daljnjim istraživanjem tj. regeneracijom kalusnoga tkiva. Regeneracija biljaka predstavlja stvaranje novih organa, embrija i čitavih biljaka, obično kao odgovor na određeni poticaj. Regeneracija je glavni ishod kulture biljnog tkiva gdje se somatska embriogeneza i organogeneza često eksperimentiraju za regeneraciju genetski transformiranih biljaka. Proces prelaska somatskih stanica u biljne naziva se somatska ili

aseksualna embriogeneza, dok se proces stvaranja organa pod utjecajem nekoliko hormona *in vitro* naziva organogeneza. Somatska embriogeneza omogućava korištenje somatskih embrija kao sintetičko sjeme, međutim primjena somatske embriogeneze nije ograničena na tehnologiju sintetičkog sjemena (Bhatia i Bera., 2015.).

Mahmood i Razzaq (2017.) radili su procjenu regeneracijskog potencijala eksplantata na nezrelom embriju, zreom embriju, ES zreom embriju i vršnom meristemu nakon faze formiranja kalusa. Kalusi su inducirani iz svojeg eksplantata koristeći najprikladniji medij u razdoblju od 3 tjedna. To su morfogeni kalusi tj. nodularni i čvrsti kalusi s blijedom do blijedo-žutom površinom koji pokazuju visok potencijal, a zatim su preusmjereni na regeneracijski medij (MS bazalni medij + 30 g/L saharoze + 6 g/L agra + različite kombinacije fitohormona). Kalusi su inkubirani na 26°C sa 16 sati svjetlosnim i 8 sati tamnim fotoperiodom. Nakon 25-30 dana kalusi s jasno diferenciranim izbojcima dobiveni su kao regeneracija kalusa.

Istraživanje utjecaja različitih kombinacija 2,4-D i BA na višestrukim diferencijacijama izdanaka pri regeneraciji istraživali su Ahmad i sur. (2001.). Zaključuje se da umnožavanje izdanaka nije moguće ako medij ne sadrži niti jedan fitohormon te ukazuju da sam BA u različitim koncentracijama ima sposobnost umnožiti izdanke bilo kojeg genotipa, a najveći rast su utvrdili pri kombinaciji 0,5 mgL⁻¹ 2,4-D i BA.

Navedena istraživanja o sastavu medija za indukciju kalusa te za regeneraciju biljaka će poslužiti kao nastavak ovoga istraživanja.

4. ZAKLJUČAK

U sklopu rada je opisano istraživanje visine frekvencije indukcije kalusa iz vršnog meristema pšenice. Zrna oba genotipa su sterilizirana po protokolu te postavljena na medije jednakog sastava. Nakon pojave izdanka pšenice, vršni meristem se reza i ponovno postavlja na medij. Korišteni genotipovi Srpanjka i Super Žitarka pokazali su srednje visoki postotak inducirano kalusa. Mogućnost daljnjeg istraživanja nije isključena, s medijima različitog sastava, raznovrsnim genotipovima i većom oprežnošću na sterilnost i čistoću eksplantata, pribora i medija. Prethodna i daljnja istraživanja na temu indukcije kalusa će pridonijeti budućim naraštajima u problemima uzgoja pšenice povezanim s naglim klimatskim promjenama, manjkom organske tvari u tlu i nedostatkom površina za uzgoj pšenice. Također će pridonijeti genetskoj modifikaciji i prilagodbi pšenice navedenim poteškoćama.

5. POPIS LITERATURE

1. Ahmad, A., Zhong, H., Wang, W. Sticklen, B. M. (2001.): Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38:163-167; 2,4
2. Ali, G., Rashid, U., Ali, S., Ayub, N. i Masood, M. S. (2009.): Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology* 12(3); 1,3
3. Amić, D. (2007.): Organska kemija za studente agronomске škole. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Fakultet Agrobiotehničkih znanosti; 126-127
4. Bačić, T. (2003.): Morfologija i anatomija bilja. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek; 36
5. Benderradji, L., Brini, F., Kellou, K., Ykhlef, N., Djekoun, A., Masmoudi, K. i Bouzerzour, H. (2011.): Callus Induction, Proliferation and Plantlets Redgeneration of Two Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes under Saline and Heat Stress Conditions. *International Scholarly Research Network*; 1-8
6. Bhatia, S., Bera, T. (2015.): Somatic Embryogenesis and organogenesis, Modern applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences; 209-230
7. Chu, Z. Chen, J., Sun, J., Dong, Z., Yang, X., Wang, Y., Xu, H., Zhang, X., Chen, F., Cui, D. (2017.): De novo assembly and comparative analysis of the transcriptome of embryogenic callus formation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology* 17:244; 2
8. CIMMYT, Applied Biotechnology Center (1999.): Laboratory protocols CIMMYT Applied Genetic Engineering Laboratory; 13
9. Denffer, D. von, Ziegler, H. (1988.): Botanika. Morfologija i fiziologija, 2. izdanje. Školska knjiga. Zagreb; 109-114
10. Feher, A., (2019.): Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Frontiers in Plant Science journal, Plant Development and EvoDevo section*; 1-3
11. Iqbal, M., Iqbal, Raja N., Asif, S., Ilyas, N. Hussain, M., Yasmeen, F. i sur. (2016.): *In vitro* study of Callogenesis and Regeneration Potential of Elite Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars, *American Journal of Plant Sciences*, 7, 2515-2526; 2518

12. Jasdeep, P., Avijit, T., Varsha, S., Harinder, V. (2019.): Cultivar specific response of callus induction and plant regeneration from mature embryos in different elite Indian wheat. *Research Journal of Biotechnology* 14 (2); 6
13. Jelaska, S. (1994.): *Kultura biljnih stanica i tkiva – temeljna istraživanja i primjena*. Školska knjiga, Zagreb; 97, 45, 58
14. Mahmood, I., Razaaq, A. (2017.): Responses of explant type of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes to different tissue culture media. Department of Agronomy, Faculty of Crop and Food Sciences, Rawalpindi, Pakistan; 4
15. Parađiković, N.: *Principi florikulture Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku*, Osijek; 21
16. Pevalek-Kozlina, B. (2003.): *Fiziologija bilja*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb; 282-295
17. Pierik, R. L. M. (1987.): *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands; 54-64
18. Sarker, K. K., Kabir, A. H., Sharmin, S. A., Nasrin, Z. i Alam, M.F. (2007.): Improved Somatic Embryogenesis using L-asparagine in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sjemenarstvo* (24) 3-4; 188-189
19. Tuskan, G.A., Mewalal, R., Gunter, L.E., Palla, K.J., Jacobson, D.A. (2018.): Defining the genetic components of callus formation. A GWAS approach. *Plos One* 13(8); 11
20. Tyankova, N.D., Zagorska, N.A. (2000.): Genetic control of *In vitro* response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:524-530; 524
21. Viertel, K., Hess, D. (1996.): Shoot tips of wheat as an alternative source of regenerable embryogenic callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 183-188; 183-186
22. Poljoprivredni institut Osijek: <https://www.poljinos.hr/> (Datum pristupa: 15.7.2019.)