

Љиљана Радојевић
Слађана Јевремовић
Биљана Лазић

UDK: 58.084:582.165.7:
Оригинални научни рад

КУЛТУРА *IN VITRO* СЕГМЕНАТА СТАБЛА КАО МЕТОД ЗА МИКРОПРОПАГАЦИЈУ ХРИЗАНТЕМА

Извод: Проучаван је утицај неколико хранљивих подлога на *in vitro* умножавање изданака 13 сорти хризантема које се гаје у нашој земљи. Хранљиве подлоге обogaћене α -нафтил сирћетном и бензил-аминопурином су биле најефикасније за микропропагацију изданака. Највећи индекс умножавања изданака је постигнут код сорте „Tigerrag“. Успешно ожиљавање (81-100%), у зависности од сорте, је постигнуто на хранљивој подлози без хормона. Аклиматизација *in vitro* биљчица хризантема се кретала у опсегу 55-84%. После гајења у условима поља при одоварајућем фотопериоду све сорте су цветале.

Кључне речи: *Chrysanthemum morifolium*, сегмент стабла, микропропагација изданака, органогенеза, ожиљавање

STEM SEGMENT *IN VITRO* CULTURE OF CHRYSANTHEMUM AS A METHOD FOR MICROPROPAGATION

Abstract: The effect of several nutritional media on *in vitro* shoot multiplication of 13 chrysanthemum cultivars grown in our country was investigated. Medium supplemented with α -naphthalenacetic acid and 6-benzylaminopurine was the most efficient for shoot multiplication. The highest shoot multiplication index was achieved for cultivar „Tigerrag“. Successful rooting of shoots, depending on cultivars, was obtained on a hormone free medium. Acclimatization of *in vitro* plants was 55-84%. After growing in the field under suitable photoperiod regime, all cultivars flowered.

Key words: *Chrysanthemum morifolium*, stem segment, shoot multiplication, organogenesis, rooting

др Љиљана Радојевић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду
мр Слађана Јевремовић, истраживач сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду

Биљана Лазић, молекуларни биолог, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду

1. УВОД

Хризантема (тзв. јесења ружа) припада групи веома значајних декоративних врста, погодних за различите начине гајења током целе године. Род *Chrysanthemum* обухвата око 100 једногодишњих и вишегодишњих врста које су распрострањене у Африци, Америци, Азији и Европи, а најзаступљенија од њих је *Chrysanthemum indicum*. Према свом хабитусу, хризантеме се могу сврстати у пет група: 1. кинеске хризантеме, чије су латице савијене на доле; 2. јапанске, којима су латице подигнуте на горе; 3. крупноцветне, чији је пречник цвета 20-30 cm; 4. ситноцветне, са пречником цвета 5-10 cm и 5. декоративне-европске селекције, које уједињују једноставност гајења ситноцветних и декоративних крупноцветних хризантема (Поткоњак А., Дурман-Вујошевић К., 1994). При класичном одгајању хризантема требало би водити рачуна о условима гајења, а то су: полусеновит локалитет, растресито земљиште и одређена влажност.

Хризантема је добила име по грчкој речи *Chrysos* (злато) и *anthemos* (цвет), јер је највећи број врста управо жуте боје. Први записи о хризантеми потичу још од пре 2500 година, када се помиње у записима кинеског филозофа Конфучија. Из Кине је донета у Кореју, а затим у Јапан. Међутим, у Европу, тј. у Енглеску, пренета је половином XVIII века где почиње интензивно да се гаји. Размножавају се вршним резницама, деобом бокора у подножју матичне биљке или семеном у пролеће. Резнице се ожиљавају у влажном песку на 18°C у мају и јуну (Лазић Б. *et al.*, 1994).

Хризантеме се гаје пре свега као резани цвет, саксијско, балконско, али и као баштенско цвеће, у виду допуне јесењем цветном асортиману у парковима. У култури *in vitro* хризантеме су уведене 70-тих година овог века. Различити типови почетних експлантата многобројних сорти гајени су на чврстим и/или течним хранљивим подлогама са различитим балансом ауксина и цитокинина. Успешно формирање и умножавање изданака, као и целих биљака, остварено је у култури калуса (Hill G.P., 1968, Вен-Јаасов Ј., Langhans R.W., 1972), петиола и врха стабла (Bush S.R. *et al.*, 1976), меристема (Sangwan R.S. *et al.*, 1987), сегмената стабла (Lu C.Y. *et al.*, 1990) и листова (Bhattacharya P. *et al.*, 1990, Kaul V. *et al.*, 1990, Lee T. *et al.*, 1997). Регенерација биљака хризантема је постигнута и соматском ембриогенезом (Pavingerova D. *et al.*, 1994, Oka S. *et al.*, 1999). Последњих година се интензивно истражује могућност генетичких трансформација у култури *in vitro* хризантема (Sherman J.M. *et al.*, 1998, Zücker A. *et al.*, 1998).

Предмет овог рада су истраживања о *in vitro* размножавању и ожиљавању неколико сорти хризантема које су интересантне за цвећарство у нашој земљи.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

За успостављање *in vitro* културе изданака коришћени су сегменти стабла са једном до две интернодије 13 сорти хризантема, cvs: Aibert Heyn („АН“), Sorper

Spider („CS“), June Rose („JR“), June Yellow („JY“), Papagaj („P“), Reagan Splendid („RSp“), Reagan Sunny („RS“), Reagan White („RW“), Tigerrag („T“), Vesuvio („V“), Violet Spider („VS“), White Spider („WS“) и Yellow Jubilee („YJ“). Површинска стерилизација биљног материјала извршена је стандардном методом стерилизације (Радојевић Љ. *et al.*, 1994). Индуkcија органогенезе у култури сегмената стабла је постигнута и недавно описана у раду Радојевић и сарадници (2000).

Све хранљиве подлоге су садржале MS минерални раствор (Murashige T., Skoog F., 1962), 3% сахарозу, 0,7% агара и ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): мио-инозитол 100, витамин Б₁ 30, никотинску киселину 10, тирозин 100 и аденин сулфат 80 (MS подлога). За испитивање утицаја одређеног баланса ауксина и цитокинина на формирање и умножавање изданака свих проучаваних сорти хризантема коришћене су четири хранљиве подлоге: А₁=MS+0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ α -нафтил сирћетна киселина (НАА)+1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ кинетин (КИН); А₂=MS+0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ НАА+1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ КИН; Б₁=MS+0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ НАА+1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ б-бензиламинопурина (БАП); Б₂=MS+0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ НАА+1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ БАП. Изданци (2-3 *cm*) су оживљавани на MS хранљивој подлози без хормона. Ефикасност оживљања изданака је одређена на основу учешћа оживљених изданака ($\mu\%$), броја формираних коренова, као и дужине најдуже адвентивног корена по изданку.

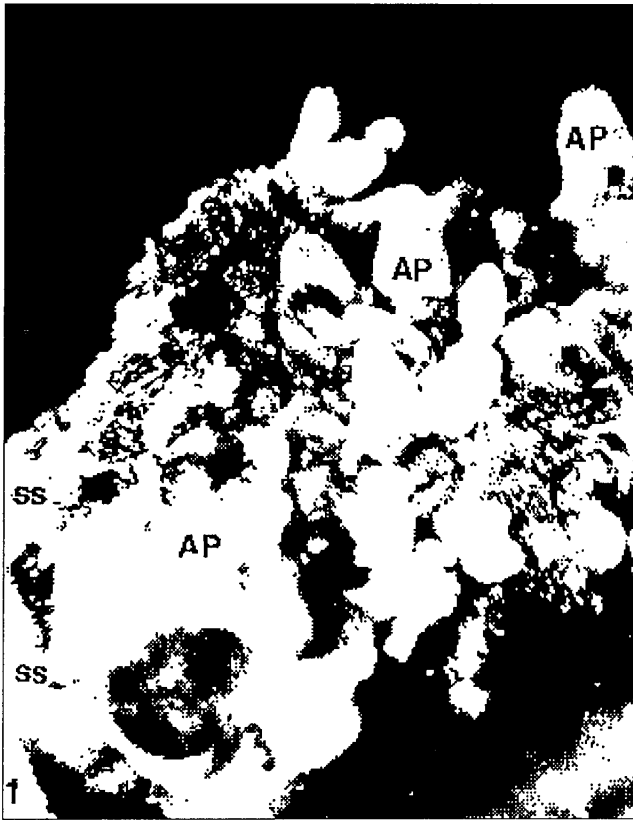
Пре стерилизације, рН хранљивих подлога је подешен на 5,8 додавањем 1 N NaOH или 1 N HCl. Све хранљиве подлоге су стерилисане 25 *min* у аутоклаву на температури од 114°C и притиску од 0,8 *atm*. Културе су гајене на белој светлости флуоресцентних лампи „Тесла“, интезитета 20W, 4500°K, са фотопериодом 16^h светлости и 8^h мрака, при температури 25±1°C. Аклиматизација и даље растење оживљених биљака до цветања одвијало се у мешавини перлита и тресета (3:1) у стаклари.

Резултати су подвргнути анализи варијансе (ANOVA) и LSD (least significant difference) тесту за утврђивање статистички значајних разлика између третмана.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

3.1. Формирање и умножавање изданака

Проучаван је утицај два цитокинина (КИН и БАП) у комбинацији са две концентрације ауксина (НАА), односно А (подлоге А₁ и А₂) и Б-типа подлога (подлоге Б₁ и Б₂) на формирање и умножавање изданака. У раној фази успостављања културе сегмената стабла на MS хранљивој подлози са НАА и БАП (0,5, односно 1,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), морфогенетски одговор већине експлантата се експримирао преко формирања адвентивних пупољака (слика 1). Сличан морфогенетски одговор је раније утврђен у култури сегмената стабла и код других сорти хризантеме (L и С.У. *et al.*, 1990). Развиће и умножавање изданака је било различитог интезитета на подлогама А₁ и А₂, у односу на подлоге Б₁ и Б₂ (хистограм 1). На А₁ и А₂ хранљивим подлогама које су биле обогаћене кинетином, као цитокининском компонентом у подлози, умножавање изданака није било задовољавајуће, осим код сорте „ЈУ“. Овај цитокинин је



Слика 1. Сегмент стабла (ss) сорте „Tigerrag“ у раној фази индукције и формирања адвентивних пупољака (AP) на подлози A_2 ; $\times 21$

Figure 1. Stem segment (ss) cv. „Tigerrag“ in the early phase of induction and adventitious buds (AP) formation on A_2 ; $\times 21$

побољшавање умножавања изданака ове сорте потребна додатна истраживања. Следећи нов приступ у микропропацији хортикултурних врста је употреба тидиазурона (L и C.Y., 1993) кога смо у претходном раду (Радојевић Љ. *et al.*, 2000) применили ради стимулације умножавања изданака хризантема. Међутим, због појаве негативних ефеката тидиазурона, пре свега на витрификацију изданака, што је ограничавало његову дуготрајну употребу, у овом раду смо ставили акценат на проучавање баланса и концентрације ауксина и других цитокинина (КИН и БАП) који утичу и на бољи квалитет изданака. Код свих сорти, изузимајући „JR“, очигледно је да је оптимална комбинација НАА и БАП ($0,5$, односно $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) дала најбоље резултате на умножавање и квалитет изданака.

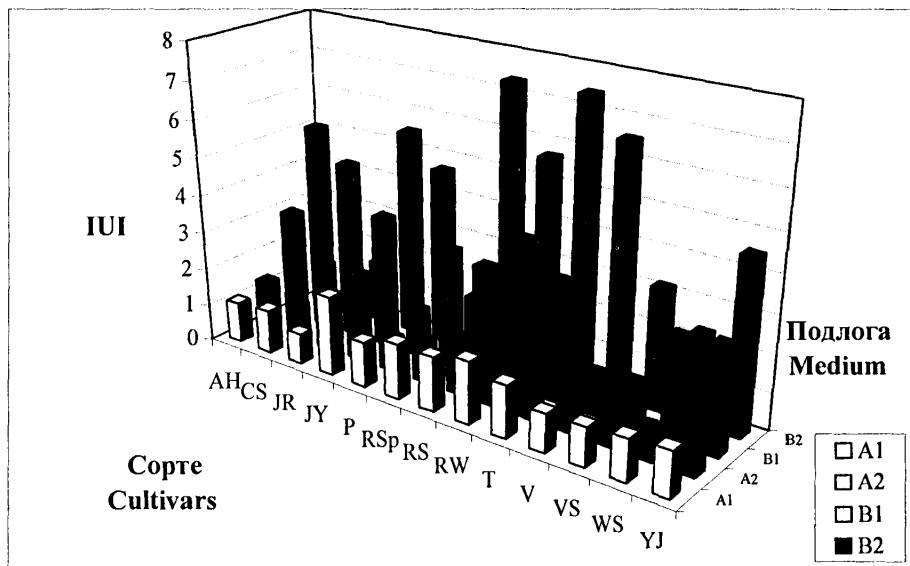
доводио до формирања и развића само једног или ретко два аксиларна пупољка. Када је хранљива подлога била обогаћена са БАП (подлоге B_1 и B_2), долазило је до знатног повећања индекса умножавања изданака код свих сорти. Повећање индекса умножавања је, зависило и од концентрације употребљеног ауксина. Хранљива подлога B_1 са нижом концентрацијом НАА ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) је била боља за умножавање изданака код сорти „WS“ и „RSp“. Код свих осталих сорти, хранљива подлога са НАА у концентрацији $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ је била повољнија за умножавање изданака. Највећи индекс умножавања изданака ($7,4$) имале су сорте „T“ и „RS“. Употребљене подлоге нису биле погодне за умножавање изданака сорте „JR“, па су за

Према протоколу Bhatta-
charya-а и сарадника (1990), у то-
ку масовне пропагације у култури
сегмената стабла *C. morifolium*,
св. „Birbal Sahní“, може се произ-
вести за годину дана $1,4 \times 10^{14}$ из-
данака. Међутим, према нашем
експерименталном протоколу за
исти период култивације може се
произвести $2,8 \times 10^{11}$ издака, на
пример за сорту „Tigerrag“. Мо-
жемо закључити да број произве-
дених издака зависи од сорте,
зрелости иницијалног експланта-
та и хранљиве подлоге када се ра-
ди о *in vitro* култури сегмената ста-
бла хризантема (Bhattacha-
rya P. *et al.*, 1990, Lu C.Y. *et al.*,
1990, Јевремовић С., Радоје-
вић Љ., 1995).



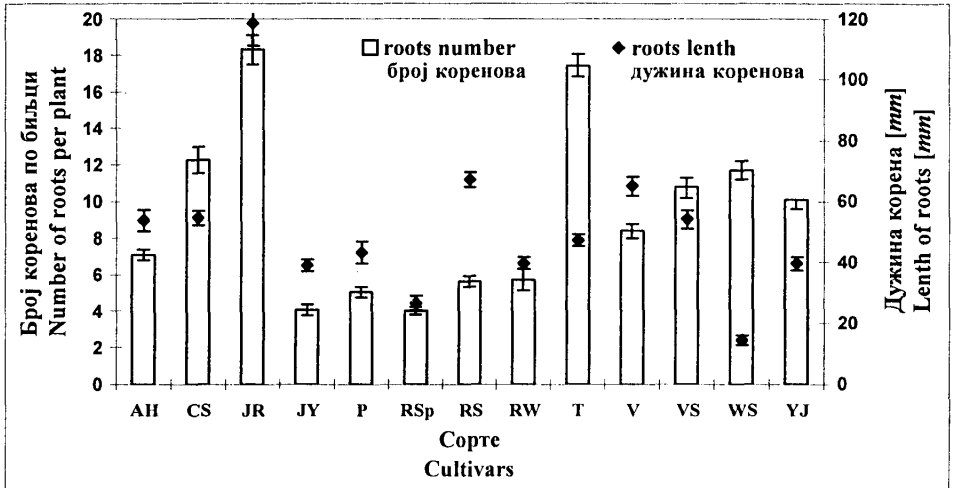
Слика 2. Ожиљене биљнице сорте „Tigerrag“ по-
сле месец дана гајења на MS ранљивој по-
длози без хормона

Figure 2. Rooted plantlets of cv. „Tigerrag“ after one
month on MS hormone free medium



Хистограм 1. Утицај различитих хранљивих подлога на умножавање издака 13 сорти
хризантема

Histogram 1. The effect of different culture media on shoot multiplication of 13 chrysanthe-
mum cultivars



Хистограм 2. Утицај MS хранљиве подлоге без хормона на оживљавање изданака хризантема
Histogram 2. The effect of MS hormone free medium on shoot rooting of chrysanthemum

3.2. Ожиљавање изданака

Изданци хризантема ефикасно су оживљавани на MS хранљивој подлози без хормона. После месец дана гајења на овој подлози ожиљено је приближно 95-100% изданака свих сорти, изузев код сорте „P“, чији су се изданци слабије оживљавали (81%). Ефикасност оживљавања, као и квалитет коренова, изражени су преко броја формираних коренова по биљци и просечне дужине најдужег корена (хистограм 2.). Највећи просечан број коренова по биљци формиран је код сорте „JR“ (18 коренова по биљци), а најмањи код „RSp“ и „JY“ (4 корена по биљци). Коренови сорте „JR“ су били најдужи са просечном дужином од 12 cm, док су најкраћи коренови, дужине 1,5 cm, били формиран на изданцима сорте „WS“.

3.3. Аклиматизација биљака

Биљке хризантема су се добро аклиматизовале на спољашње услове гајења. Број аклиматизованих биљака зависио је од сорте: „AH“ (71%), „CS“ (63%), „JR“ (77%), „JY“ (78%), „P“ (72%), „RSp“ (60%), „RS“ (59%), „RW“ (64%), „T“ (84%), „V“ (72%), „VS“ (69%), „WS“ (56%) и „YJ“ (55%). Биљке хризантеме су после одговарајућег фотопериода цветале, а боја цветова је била индентична матичним биљкама.

4. ЗАКЉУЧЦИ

► Микропропагација код 13 сорти хризантема могућа је полазећи од сегмента стабла;

- ▷ Оптимала подлога за формирање и умножавање изданака је Б₂ подлога са НАА и БАП (0,5, односно 1 mg·L⁻¹);
- ▷ Ефикасно ожиљавање изданака (95-100%) у зависности од сорте, одвијало се на MS подлози без хормона;
- ▷ Приказани протокол, уз малу модификацију у зависности од сорте, може се успешно применити за микропропагацију и других комерцијално тражених сорти хризантема.

ЛИТЕРАТУРА

- Ben-Jaacov J., Langhans R.W. (1972): *Rapid multiplication of chrysanthemum plants by stem-tip proliferation*, Hort. Sci. 7 (287-290)
- Bhattacharya P., Dey S., Das N., Bhattacharya C. (1990): *Rapid mass propagation of Chrysanthemum morifolium by callus derived from stem and leaf explants*, Plant Cell Rep. 9 (439-442)
- Bush S.R., Earle E.D., Langhans R.W. (1976): *Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, Chrysanthemum morifolium „Indianapolis“*, Amer. J. Bot. 63(6) (729-737)
- Hill G.P. (1968): *Shoot formation in tissue cultures of Chrysanthemum „Bronze Pride“*, Physiol. Plant. 21 (386-389)
- Јевремовић С., Радојевић Јб. (1995): *In vitro plant regeneration from stem segments of several cultivars of chrysanthemum (Chrysanthemum morifolium Ramat.)*, Гласник Инст. бот. и Ботаничке баште Универзитета у Београду, том XXIX (107-114)
- Kaul V., Miller R.M., Hutchinson J.F., Richards D. (1990): *Shoot regeneration from stem and leaf explants of Dendranthema grandiflora Tzvelev (syn. Chrysanthemum morifolium Ramat.)*, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 21 (21-30)
- Лазих Б., Нинић-Тодоровић Ј., Ћупурдија Н. (1994): *Агробиолошке основе производње хризантеме*, Развој производње и коришћење хризантеме, Кањижа (2-10)
- Lu C.Y. (1993): *The use of thidiazuron in tissue culture*, In Vitro Cell. Dev. Biol. 29P (92-96)
- Lu C.Y., Nugent G., Wardley T. (1990): *Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (Chrysanthemum morifolium Ramat. cv. „Royal Purple“)*, Plant Cell Rep. 8 (733-736)
- Lee T., Huang N.E.E., Pua E.C. (1997): *High frequency shoot regeneration from leaf disc explants of garland chrysanthemum (Chrysanthemum coronarium L.) in vitro*, Plant Sci. 126 (219-226)
- Murashige T., Skoog F. (1962): *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*, Physiol. Plant. 15 (473-497)
- Oka S., Murioka O., Abe O., Nakajima S.N. (1999): *Adventitious bud and embryoid formation in garland chrysanthemum leaf culture*, J. Jap. Soc. Hort. Sci. 68(1) (70-72)
- Pavingerová D., Dostál J., Bisková R., Benetka V. (1994): *Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation of chrysanthemum*, Plant Sci. 97 (95-101)
- Поткоњак А., Дурман-Вујошевић К. (1994): *Најзначајније нове сорте хризантема*, Зборник радова „Дани хризантеме“, Кањижа (11-16)

- Радојевић Љ., Маринковић Н., Здравковић-Кораћ С., Јевремовић С. (1994): *Примена различитих поступака културе у микропропагацији афричке љубичице, хризантеме и каранфила*, Савр. пољопр. 42(6) (117-127)
- Радојевић Љ., Јевремовић С., Лазич Б. (2000): *Утицај тидиазурона на in vitro умножавање изданака хризантема (Chrysanthemum morifolium Ramat)*, Савр. пољопр. (у штампи)
- Sangwan R.S., Detrez C., Sangwan-Norreel B.C. (1987): *In vitro culture of shoot tip meristems in some higher plants*, Acta hort. 212 (661-666)
- Sherman J.M., Moyer J.W., Daub M.E. (1998): *A regeneration and Agrobacterium-mediated transformation system for genetically diverse Chrysanthemum cultivars*, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123(2) (189-194)
- Züker A., Tzifira T., Vainstein A. (1998): *Genetic engineering for cut-flower improvement*, Biotech. Adv., Vol 16(1) (33-79)

Ljiljana Radojević
Slađana Jevremović
Biljana Lazić

STEM SEGMENT *IN VITRO* CULTURE OF CHRYSANTHEMUM AS A METHOD FOR MICROPROPAGATION

Summary

Chrysanthemum is one of three the most important cut flowers in the world. In the earlier work with chrysanthemum, micropropagation of *C. morifolium* was obtained from different explants, such as shoot tips, receptacles, petal segments, leaf culture, etc. The most efficient method of micropropagation was stem segment culture with segments taken either from the top of the cuttings (Lu C.Y. et al., 1990) or nodal/internodal parts of stem segments (Bhattacharya P. et al., 1990).

In this work, we investigated the morphogenic response of nodal segments of 13 chrysanthemum cultivars: Aibert Heyn („AH“), Copper Spider („CS“), June Rose („JR“), June Yellow („JY“), Papagaj („P“), Reagan Splendid („RSp“), Reagan Sunny („RS“), Reagan White („RW“), Tigerrag („T“), Vesuvio („V“), Violet Spider („VS“), White Spider („WS“) and Yellow Jubilee („YJ“) subcultured on MS media supplemented with α -naphthalenacetic acid and kinetin or 6-benzylaminopurine. The most suitable medium for all cultivars, except „JR“, was MS medium supplemented with α -naphthalenacetic acid and 6-benzylaminopurine (0.5, 1.0 mg·L⁻¹, respectively). The highest shoot multiplication index (7.4) was achieved for cultivars „Tigerrag“ and „June Rose“. Shoot rooting was efficient on a MS hormone free medium for all cultivars and ranged 81-100%. Root number and average length of the longest root were investigated for the estimation of rooting efficiency and root quality. The highest number of roots per plant formed cv. „June Rose“ (18 roots/plant), whereas only four roots were formed for „Reagan Splendid“ and „June Yellow“. Acclimatization of plants was satisfactory in the following cultivars: „AH“ (71%), „CS“ (63%), „JR“ (77%), „JY“ (78%), „P“ (72%), „RSp“ (60%), „RS“ (59%), „RW“ (64%), „T“ (84%), „V“ (72%), „VS“ (69%), „WS“ (56%) and „YJ“ (55%). There were no mutational changes on leaves and flowers in „micro“ plants after greenhouse growth.

Presented protocol for micropropagation of these chrysanthemum cultivars can be used for propagation of other commercially valuable cultivars which are important for horticulture in our country.