

Regeneracija šećerne repe (*Beta vulgaris* L.) od hipokotila u kulturi in vitro

Svetlana Tošić¹, Radmila Trajković², Svetlana Radović³, Tatjana Mitrović¹, Vesna Manojlović-Đorđević⁴

¹Odsek za biologiju sa ekologijom, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Nišu

²Odsek za biologiju, Prirodno-matematički fakultet Kosovska Mitrovica

³Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

⁴AD Selekcija - Zavod za šećernu repu, Aleksinac

Abstract:

Tošić, S., Trajković, R., Radović, S., Mitrović, T., Manojlović-Đorđević, V.: Regeneration of Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) from hypocotyle in vitro culture. Proceeding of the 8th Symposium on Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Niš, 2005.

In this paper represented investigation of regeneration of sugar beet from hypocotyle in vitro culture.

Key words: sugar beet, regeneration, hypocotyle, in vitro culture.

Uvod

Šećerna repa (*Beta vulgaris* L., fam. *Chenopodiaceae*) je poreklom od divljih vrsta sa obala sredozemnog mora. Odabiranjem i ukrštanjem postala je višegodišnja. U kulturu je uvedena krajem 18 veka. U našoj zemlji su u periodu od 1892.g. do 1912.g. izgrađene fabrike za preradu šećerne repe u Beogradu, Zrenjaninu, Vrbasu, Čupriji, Crvenki i Belom Manastiru. (Đokić, 1988).

Šećerna repa je dvogodišnja stranooplodna biljka sa dvopolnim cvetovima. U prvoj godini obrazuje koren i lisnu rozetu, a u drugoj godini nadzemno stablo i cvetove. Postoje i genotipovi koji imaju osobine jednogodišnjih biljaka, kao i genotipovi koji podnose samooplodnju. Morfologija korena je pod velikim uticajem spoljašnjih i unutrašnjih faktora. Na korenu se razlikuju: glava korena (*epikotyl*), vrat korena (*hipokotyl*), zadebljanje korena-repa (*radix*) i rep korena. Iz glavnog korena izrastaju bočni korenčići i korenske dlačice koje su raspoređene u dve brazde

korena. Plodonošno stablo se razvija u drugoj godini vegetacije, pošto repa prođe jarovizaciju i svetlosni stadijum. Cvetanje repe traje 30-40 dana, ali oplodnja traje 10 dana. Dvopolni cvet nalazi se u pazuhu bočnih grana ili je u pazuhu sedećih cvetnih listića (Đokić, 1992.). Šećerna repa dobro podnosi niske, ali i visoke temperature. Niče na 1-2°C sporije, ili brže na 7-8 °C. Najveće nagomilavanje šećera u korenu dešava se tokom avgusta i septembra.

Primarno, šećerna repa ima značaj kao sirovina za dobijanje šećera, ali od važnosti su i nusproizvodi bogati kalijumom i mineralnim materijama, zbog čega se koriste kao stočna hrana. U proizvodnji šećera u svetu šećerna repa učestvuje sa 40% od čega 85% otpada na proizvodnju u Evropi. U našoj zemlji ostvaruje se prinos korena šećerne repe oko 50 t/ha, pri čemu se očekuje proizvodnja šećera od 6,25 t/ha. Za uspešniju proizvodnju preporučuju se sorte koje imaju visok genetski potencijal rodosti, zadovoljavajuću otpornost prema bolestima i dobre tehnološke osobine.

Šećerna repa ima velike zahteve prema uslovima uspevanja. Zato njeno gajenje na mikroplanu tj. na maloj površini u uslovima in vitro, omogućava variranje različitih fizičkih i hemijskih faktora, u cilju njihove optimizacije za što uspešnije gajenje šećerne repe. Aktivno izučavanje šećerne repe u in vitro uslovima od značaja je za njeno praktično umnožavanje i selekciju odgovarajućih sorti. Šećerna repa se može vegetativno umnožavati na klasične načine, ali je to ograničeno na mali broj jedinki. Vegetativna mikropropagacija (in vitro) obezbeđuje 10^5 - 10^6 biljaka godišnje (S l a v o v a, V.1980).

Cilj rada je da se dobije takva koncentracija hormona, makro- i mikroelemenata, u in vitro uslovima koja bi dovela do snažnog razvoja korenske mase i neometenog rasta izdanka.

Materijal i metode

Kao početni materijal za ostvarivanje cilja koristili smo seme *Beta vulgaris* L. dva različita genotipa: KWS "O"- diploid i 4R KW 86 "O"- tetraploid. Sa isključilih semena uzimali smo hipokotili za dalji rad kao eksplantate. U fazi mikropropagacije izdanci su održavani pasažiranjem približno na mesec dana. Pošto smo dobili zadovoljavajući indeks umnožavanja, izdanke smo prebacili na podlogu za ožiljavanje. U ovoj etapi varirana je koncentracija IBA i vreme trajanja tretmana. Izračunavan je procenat ožiljavanja i merena je prosečna dužina korena.

Za uspostavljanje i održavanje kulture šećerne repe u eksperimentu korišćene su podloge sa kombinacijom mineralnih soli i vitamina po Murashige i Skoog-u ili Gamborg-u.

U svim podlogama kao izvor ugljenika korišćena je saharoza u koncentraciji 20 g/l, a očvršćavanje podloge je ostvareno primenom agara 8 g/l. Sve kulture su rasle pod fotorežimom od 16 sati svetla i 8 sati mraka na 23°C.

Podloga za naklijavanje semena sadrži kombinaciju mineralnih soli i vitamina po Murashige i Skoog-u. U mikropropagaciji korišćena je podloga po Gamborg-u uz dodatak vitamina i hormona (BAP – 0,3 mg/ml). Za ukorenjavanje je primenjena podloga po Gamborg-u suplementirana vitaminima, glicinom i hormonom-IBA sledećih koncentracija (0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 i 2) mg/l.

Eksperiment je započet sterilizacijom semena. Semena su držana 1 min u alkoholu uz dodatak kapi deterdženta. Posle trostrukog ispiranja destilisanom vodom, semena su potopljena u 60 % H_2SO_4 u trajanju od 5 min, a potom 3 puta isprana sterilisanom vodom, nakon čega su ostavljena 15

min u 30% rastvoru H_2O_2 . Na kraju su tri puta isprana destilisanom vodom i ostavljena 15 min u njoj. Osušena semena u petri kutijama preneti su pojedinačno u epruvete, na podlogu za isključavanje semena.

Za dalji rad uzimani su hipokotili sa isključilih semena i na podlozi za mikropropagaciju održavani su izdanci.

Rezultati i diskusija

Primećeno je da su semena su na podlozi za isključavanje počela da klijavu već nakon 5 dana kada je ostvarena klijavost 29,2% za genotip 4R KW 86 "O" i 20,8% za genotip KWS "O". Ovakvi rezultati su u skladu s činjenicom da u optimalnim uslovima bubrenje traje 3 do 5 dana i da se za to vreme aktiviraju fitohormoni. Minimalna temperatura pri kojoj seme šećerne repe klija je 1-4°C, optimalna je oko 25 °C a maksimalna je 28-30 °C. (K a s t o r i, 1992.). Nakon 21 dana zabeležili smo ostvarenu klijavost oko 80%. Nastali klijanac ima 2 dobro razvijena kotiledona eliptičnog oblika koji su funkcionalno aktivni do pojave trećeg para listova (D o k i ć, 1992.).

U fazi mikropropagacije korišćen je BAP (6-benzil aminopurin) u koncentraciji 0,3 mg/ml. Konstatovali smo da je pimenjena koncentracija BAP-a zadovoljavajuće uticala na formiranje zdravih, zelenih izdanaka favorizujući primarni metabolizam i određene faze vegetativnog razvića. Uticaj BAP-a na nastanak novih pupoljaka u fazi vegetativne propagacije in vitro je analiziran za različite vrste (Z a m a n i, ??). Za šećernu repu se često koristi podloga koja sadrži BAP u koncentraciji od 0,5mg/l (A t a n a s o v, 1979.)

Vegetativna propagacija se zasniva na stimulanju razvića lateralnih pupoljaka korišćenjem citokinina. Za hormonski sastav podloge u ovoj fazi bitno je da se suzbije pojava i rast nediferenciranog kalusa i favorizuje rast vršnog i aksilarnog meristema. (V i n t e r h a l t e r et al., 1996.) a što smo u eksperimentu i postigli. Citokinini oslobađaju od apikalne dominacije aksilarne pupoljke, dopuštaju razviće bočnih pupoljaka iz lisnih pazuha i stimulišu izduživanje svih pupoljaka na eksplantatu. Podloga nije sadržavala auksine pošto je za šećernu repu svojstveno relativno visoko prisustvo endogenih auksina. Prednost metoda bočnih pupoljaka za umnožavanje in vitro je u sledećem: 1) metod je jednostavniji od drugih metoda umnožavanja 2) obim umnožavanja je relativno brz 3) genetička stabilnost se najčešće održava i 4) rasteenje dobijenih biljaka je veoma dobro.

Da bi se izdanci lakše ožilili treba da dostignu odgovarajuću dužinu 2-3 cm što smo postigli pasažiranjem na mesec dana. Ovakvi izdanci preneti su na podlogu za ožiljavanje.

Krupniji eksplanti lakše regenerišu od sitnijih jer imaju veću količinu rezervne hrane. Da bi se indukovalo obrazovanje adventivnih korenova posle propagacije bočnih izdanaka, dodaju se auksini, a izostavljaju citokinini (Marić, 1995.). Moguće je prisustvo rezidualnih citokinina iz faze umnožavanja pa bi njihovo prisustvo po dodatku istog hormona podlozi za ukorenjavanje remetilo odnos citokinin-auksin u korist prvog. Kako IAA nije mnogo efikasna kada se koristi za biljke koje se teško ožiljavaju, upotrebljen je hormon IBA (Tetu et al., 1987., Harms et al., 1983.)

Rezultati su pokazali (tab. 1) da prosečna dužina korena genotipa 4R KW 86 "O" opada od 30 mm do 20,33 mm pri porastu koncentracije IBA od 0,1-1 mg/ml, u prvih 25 dana trajanja ukorenjavanja, dok je za isto vreme na podlozi sa IBA 2 mg/ml prosečna dužina korena najveća 33,66 mm. Za sve testirane koncentracije IBA-e, prosečna dužina korena izdanaka koji su ukorenjeni u drugom vremenskom intervalu 25-44 dana, je manja i još je manja u trećem vremenskom intervalu 44-54 dana, idući i do 50% manje u odnosu na prvi interval (sl. 1).

Zapaženo je da već u prvih 25 dana- I interval, na svim podlogama dolazi do ožiljavanja i da je je ono najefikasnije pri najvećoj koncentraciji IBA 2 mg/ml (sl. 2). S obzirom na takvu, relativno brzu indukciju korena, pretpostavljamo da primena IBA-e u većoj koncentraciji u podlozi za ukorenjavanje može povećati frekvenciju ćelijskih deoba. (Owens et al. 1992., Gronros, 1988.)

Takođe, beležimo da je u II vremenskom intervalu u prisustvu IBA-e u koncentraciji od 0,1-0,5 mg/ml dobijen približno isti procenat regeneranata kao i u prvom intervalu. Na podlozi sa IBA 1 mg/ml procenat ukorenjenih izdanaka u II intervalu (42,85%) je dosta veći nego u I intervalu (14,28%). Slično se dešava i na podlozi sa IBA 2 mg/ml gde su za poređenje istih intervala dobijene vrednosti bile 30% u I i 56,66% u II intervalu (sl. 2).

Na podlogama sa nižom koncentracijom IBA-e 0,1-0,2mg/ml nismo evidentirali ukorenjavanje u III intervalu, dok smo na podlogama koje sadrže veće koncentracije IBA-e, u istom intervalu konstatovali ožiljavanje. Zaključili smo da je pri koncentraciji IBA-e od 1mg/ml isti procenat ukorenjavanja kao i u II intervalu, dok pri koncentraciji IBA-e od 0,5mg/ml i 2mg/ml procenat ukorenjavanja nije viši od 11,43% i manji je nego u II intervalu (sl. 2).

Istovremeno smo pratili i regenerativni kapacitet drugog genotipa KWS"O" (tab. 2). Pokazalo se da je prosečna dužina korena ukorenjenih izdanaka KWS"O" genotipa, u prvom intervalu najveća na podlozi sa IBA u koncentraciji od 0,5 mg/ml. Za vrednosti koncentracije IBA 1 mg/ml i 2 mg/ml izmerili smo manju prosečnu dužinu korena u prvih 25 dana. U sledećem vremenskom intervalu prosečna dužina korena raste sa porastom koncentracije IBA 0,1-0,5 mg/ml a zatim opada pri većim koncentracijama. Takođe, beležimo da je za vrednosti koncentracije IBA 0,5 i 1 mg/ml veća prosečna dužina korena ukorenjenih izdanaka u II intervalu, nego u I ili III intervalu (sl. 3). Za razliku od genotipa 4R KW 86 "O" na svim podlogama beležimo ukorenjavanje izdanaka KWS"O" genotipa u III intervalu (sl. 4). Upoređujući ukorenjavanje u II i III intervalu beležimo da je u poslednjem intervalu izmerena veća prosečna dužina korena pri ekstremnim vrednostima IBA koncentracije 0,1 i 2 mg/ml nego u II intervalu. Takođe, za koncentracije IBA-e između 0,2-1 mg/ml su uočene manje vrednosti prosečne dužine korena u III nego u II intervalu.

U različitim vremenskim intervalima KWS"O" genotip ima različit potencijal ukorenjavanja izdanaka u in vitro uslovima. Tako, beležimo sledeće rezultate (sl. 4):

- Na nižim koncentracijama IBA 0,1 i 0,2 mg/ml za vreme I intervala nismo postigli ožiljavanje. U ovom intervalu regenerativni odgovor se javlja pri koncentraciji IBA 0,5 mg/ml kao i pri većim koncentracijama, gde ima približno istu vrednost.

- U II intervalu ožiljavanje se javlja na podlogama sa svim koncentracijama IBA-e i procenat ukorenjenih pupoljaka je znatno veći za vrednosti IBA 0,5-2 mg/ml nego za niže koncentracije.

- U III intervalu dobijeno je ukorenjavanje za sve vrednosti koncentracije IBA ali ne prelazi 12%.

Komparativnom analizom oba genotipa (sl. 5) očigledno je da oni pokazuju najveći procenat ukorenjavanja na podlozi sa IBA u koncentraciji od 2 mg/ml u drugom vremenskom intervalu 25-44 dana.

Uglavnom se kao optimalno vreme ukorenjavanja smatra 5 nedelja (35 dana) na podlozi koja sadrži auksine koji stimulišu pojavu korenskih primordija, pa ne čudi što je najbolji odgovor ostvaren u II intervalu (Detrez et al., 1989., Harms et al., 1983.). Nekada su i endogeni auksini dovoljni za ukorenjavanje, tako da smo uočili izvestan stepen ožiljavanja i na podlozi za multiplikaciju.

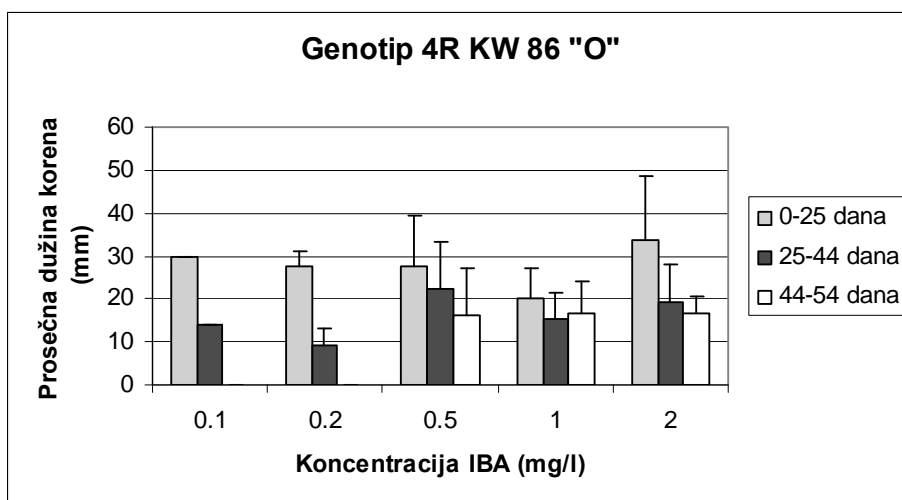
Takođe oba genotipa upoređena za svih 5 koncentracija IBA u toku III intervala, imaju najbolji procenat ukorenjavanja pri IBA 1 mg/ml. Ukupan procenat ukorenjenih pupoljaka za oba genotipa raste sa porastom koncentracije IBA-e. Na podlogama koje sadrže IBA u koncentraciji 0,1-1 mg/ml genotip KWS“O“ pokazuje bolje ukorenjavanje nego genotip 4R KW 86 “O” u proseku za 6,5%, dok je na podlozi sa 2 mg/ml obrnuto, oko 3% je bolje ožiljavanje genotipa 4R KW 86 “O”. Kako je snabdevanje kiseonikom u agaru ograničeno, zapazili smo da formirani korenovi nemaju izrazito obrazovane dlačice.

Za navedene uočene razlike, za praćene parametre između ova dva genotipa, može se pretpostaviti da različiti odgovori jesu rezultat postojećih razlika u naslednoj osnovi, a ostvareni regenerativni odgovor je uslovljen upotrebom regulatornih faktora rasta (Zhang et al. 2004.).

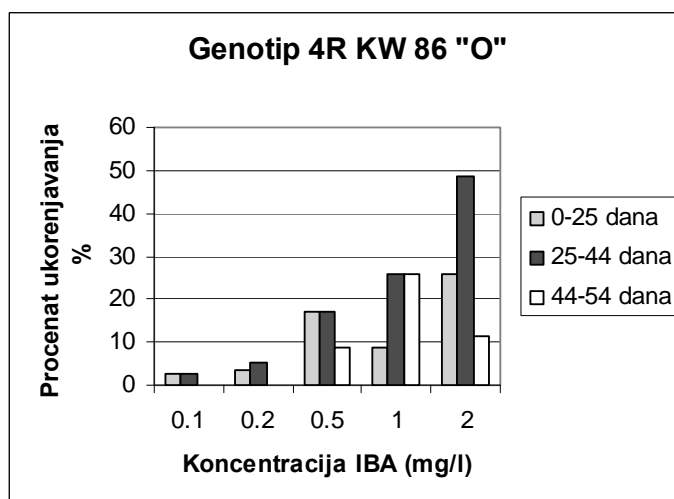
Zaključak

Poznato je da je sposobnost regeneracije određena genotipom, uslovima sredine i stupnjem razvika. Brzina rasta i grananje korena su varijabilni i zavise kako od biljne vrste, tako i od metodike i uslova ožiljavanja. U toku navedenih 15 tretmana po genotipu nastojali smo da sredinski uslovi budu istovetni, a razlika u stupnju razvika praktično nema. S obzirom da postoje razlike u regenerativnim odgovorima, može se zaključiti da su one posledica razlika u naslednoj osnovi.

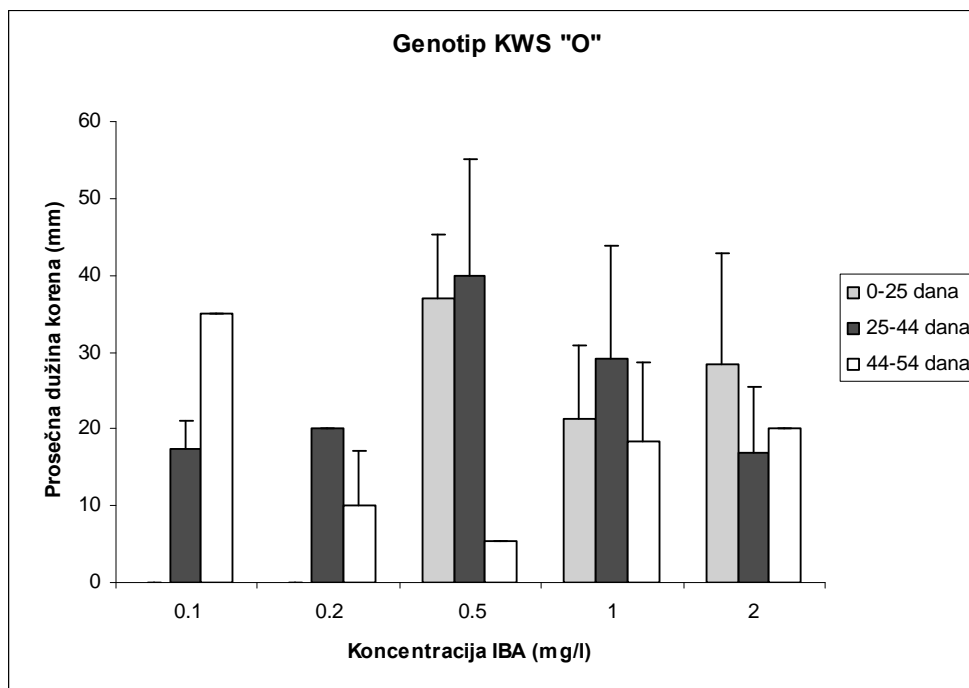
Pošto prolongirani tretman na podlozi za ukorenjavanje u izvesnoj meri doprinosi ožiljavanju, trebalo bi kod biljnih vrsta kod kojih se teže postižu rezultati u in vitro uslovima, uzeti u obzir i vreme trajanja tretmana, imajući i u vidu činjenicu da to ne zahteva dodatni utrošak materijalnih sredstava.



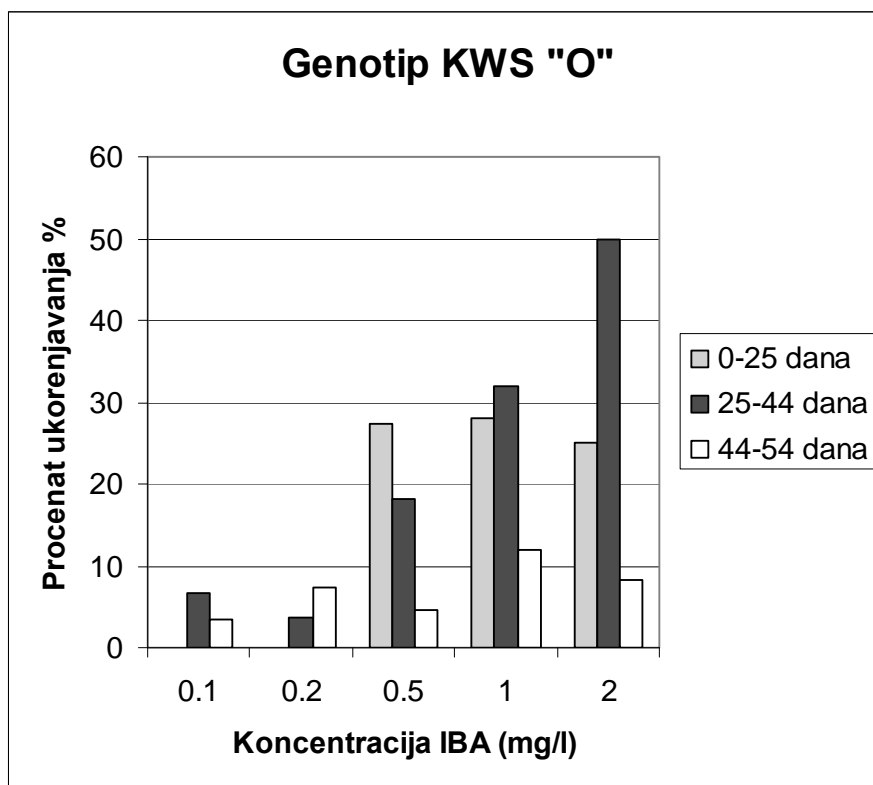
Slika 1. Uticaj različitih koncentracija IBA i različitih vremenskih tretmana na prosečnu dužinu korena



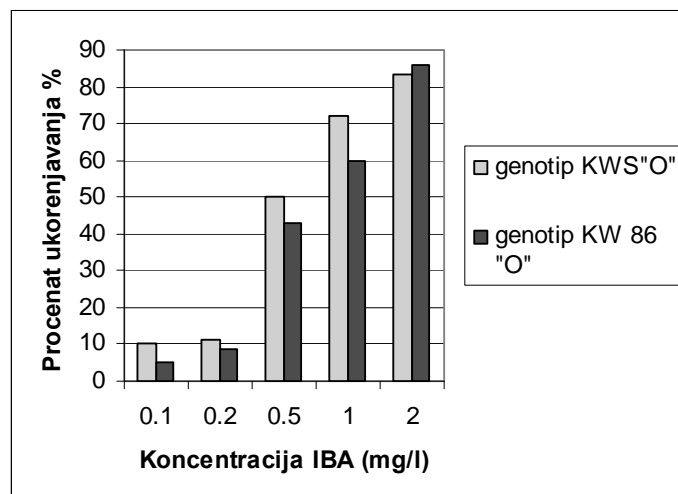
Slika 2. Procenat ukorenjenih izdanaka od ukupnog broja tretiranih u funkciji koncentracije IBA i vremenskog trajanja tretmana



Slika 3. Uticaj različitih koncentracija IBA i različitih vremenskih tretmana na prosečnu dužinu korena.



Slika 4. Procenat ukorenjenih izdanaka od ukupnog broja tretiranih u funkciji koncentracije IBA i vremenskog trajanja tretmana



Slika 5. Uticaj različitih koncentracija IBA na procenat ukorenjavanja genotipova KWS "O" i KW 86 "O"

Literatura

- Atanasov, A. I.(1988): Method for continuous bud formation in tissue cultures of Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Institute of Genetics, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia
- Detrez, C., Sangwan, R.S., Sangwan-Norreel B.S. (1989): Phenotypic and karyotypic status of *Beta vulgaris* plants regenerated from direct organogenesis in petiole culture. Theor Appl Genet 77. 462-468
- Dokić, P. (1992): Morfologija šećerne repe. U: Šećerna repa: monografija, 43-55 (Uređivački odbor: Dokić Petar et al.). „JUGOŠEĆER“ DD, Beograd
- Dokić, A.(1988):Rezultati primene genetike u stvaranju novih sorti i hibrida kulturnih biljaka. U: Biljna genetika,313-413. (Urednik: Nikola Dončev). Naučna knjiga Beograd.
- Gronroos, R. (1988): Rooting of *Pinus silvestris* and *Pinus concorta* hypocotyl cuttings in vitro. Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science
- Harms, C.T., Baktir, I. i Ofrtli, J.J. (1983): Clonal Propagation in vitro of red beet (*Beta vulgaris* ssp) by multiple adventitious shoot formation. Plant Cell tissue Organ Culture 2: 93-102
- Kastori, R. (1992): Rastenje i razviće šećerne repe. U: Šećerna repa : monografija,173-189. (Uređivački odbor: Dokić Petar et al.). „JUGIŠEĆER“DD, Beograd
- Marić, M.M. (1995): Vegetativno umnožavanje. U: Kultura biljnih tkiva 98-124. (Urednik:Jovan Zivlak). Izdavačka kuća „Draganić“ Beograd
- Owens, L.D., Debra R. (1992): Sugarbeet leaf disc culture: an improved procedure for inducing morphogenesis. Plant cell,Tissue and Organ culture 31: 195-201
- Slavova V. L., (1980): Uskoreno razmnožavane na zaharno cveklo v kultura in vitro, Fiziologija na rasteinijata, VI, (1) 35-39.
- Tetu, T., Sangwan, R. S., Sangwan-Norreel, B.S. (1987): Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus.Journal of Experimental Botany, Vo.38, No188, pp 506-517
- Vinterhalter, D., Vinterhalter, B.(1996): Kultura in vitro i mikropropagacija biljaka. (Urednik: Mr Vladislav polak). „AXIAL“P.O. Beograd, Institut za istraživanja u poljoprivredi „SRBIJA“ Beograd
- Zamani, Z., Nosrati, S. Z., Babalar, M.: Effects of benzyladenine (BA) concentrations and auxin type (IBA and IAA) on three iranian pear (*Pyrus communis* L.) cultivars under in vitro conditions. Dept. of Horticulture Faculty of agriculture The Univ. of Tehran Karaj,31587 Iran, 1340-1440 S01-P-61
- Zhang, C.L., Chen, D.F., Elliott, M.C. and Slater, A. (2004): Efficient procedures for callus induction and adventitious shoot organogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant : Vol. 40, No5, pp 475-481.

Tabela 1. Genotip 4R KW 86 "O". Uticaj različitih koncentracija IBA i različitih vremenskih tretmana na prosečnu dužinu korena i na % ukorenjenih izdanaka

Koncentracija IBA (mg/l)	0.1			0.2			0.5			1			2		
	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54
Vreme tretmana u danima	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54
Prosečna dužina korena (mm)	30	14	0	27.5	9.16	0	27.8	22.25	16.26	20.33	15.2	16.45	33.66	19.08	16.76
% ukorenjenih pupoljaka od ukupno tretiranih	2.56	2.56	0	3.57	5.35	0	17.1	17.14	8.57	8.57	25.71	25.71	25.71	48.57	11.43
% ukorenjenih pupoljaka od ukupnog broja ukorenjenih tretiranih	50	50	0	40	60	0	40	40	20	14.28	42.85	42.85	30	56.66	13.33

Tabela 2. Genotip KWS"O". Uticaj različitih koncentracija IBA i različitih vremenskih tretmana na prosečnu dužinu korena i na % ukorenjenih izdanaka

Koncentracija IBA (mg/l)	0.1			0.2			0.5			1			2		
	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54
Vreme tretmana u danima	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54	0-25	25-44	44-54
Prosečna dužina korena (mm)		17.5	35		20	10	36.25	39.15	5.3	21.28	29.2	18.33	28.33	21.26	20
% ukorenjenih pupoljaka od ukupno tretiranih		6.66	3.33		3.7	7.4	27.27	18.18	4.54	28	32	12	25	50	8.33
% ukorenjenih pupoljaka od ukupnog broja ukorenjenih tretiranih		66.66	33.33		33.33	66.66	54.54	36.36	9.09	38.88	44.44	16.66	30	60	10