

УСПОСТАВЉАЊЕ / УВОЂЕЊЕ БРЗОГ И ЕФИКАСНОГ IN VITRO СИСТЕМА РАЗМНОЖАВАЊА *Paulownia elongata*

ТАТЈАНА ВУЈОВИЋ¹
ЂУРЂИНА РУЖИЋ¹
РАДОСАВ ЦЕРОВИЋ²

Извод: Развијен је успешан протокол за микропропагацију *in vitro* *Paulownia elongata*. Као почетни експлантати препоручују се врхови изданака скидани са посађених садница, као и једнонодалне зелене резнице. Највећи индекс мултипликације је добијен на медијуму (MS) Murashige и Skoog (1962) са 4 mg l⁻¹ BA и 0,2 mg l⁻¹ NAA (1 : 4,67), а дужина осовинског изданка на медијуму MS са 4 mg l⁻¹ BA и 0,1 mg l⁻¹ IBA (2,63 cm). Процент ожиљавања је био 100% са свим употребљеним комбинацијама ауксина, али је највећи број коренова добијен на медијуму MS ½ са комбинацијом ауксина, 0,5 mg l⁻¹ NAA, 0,5 mg l⁻¹ IBA и 0,1 mg l⁻¹ GA₃ (12,5). Аклиматизација је била успешна, односно 100% у условима „мист“ измаглице. Разрађени протокол охрабрује употребу микропропагације за размножавање и ширење ове значајне шумске врсте у нашој земљи.

Кључне речи: *Paulownia elongata*, микропропагација, *in vitro*, врста експлантата

ESTABLISHMENT / INTRODUCTION OF FAST AND EFFICIENT IN VITRO PROPAGATION SYSTEM OF *Paulownia elongata*

Abstract: A successful protocol for micropropagation of *Paulownia elongata* was developed. Shoot tips stripped from planted nursery trees, as well as single-node green cuttings are recommended as initial explants. The highest multiplication index was obtained on Murashige and Skoog medium (MS) (1962) supplemented with 4 mg l⁻¹ BA and 0.2 mg l⁻¹ NAA (1 : 4.67), while the highest length of axial shoot was obtained on MS medium with 4 mg l⁻¹ BA and 0.1 mg l⁻¹ IBA (2.63 cm). Percentage of rooting was 100% with all used combination of auxins, but the highest number of roots was obtained on MS ½ with combination of 0.5 mg l⁻¹ NAA, 0.5 mg l⁻¹ IBA and 0.1 mg l⁻¹ GA₃ (12.5). Under the 'mist' irrigation the acclimatization was 100%. The developed protocol encourages the use of micropropagation for propagation and spreading of this important forest species in our country.

Keywords: *Paulownia elongata*, micropropagation, *in vitro*, explant types

1. УВОД

Paulownia је економски веома важан род из фамилије *Scrophulariaceae* који води порекло из Кине, одакле се проширила у друге делове света. Изузетно брзо расте, толерантна је на сушу и земљишне екстреме и одликује се снажним, али лаким дрветом, које се вишеструко користи за

-
- 1 др Татјана Вујовић, виши научни сарадник; др Ђурђина Ружић, научни саветник, Институт за воћарство, Чачак
 - 2 др Радосав Церовић, научни саветник, Иновациони центар ТМФ, Београд

израду намештаја, авиона, дрвених играчака, музичких инструмената, и пошумљавање (Ipekci, Z. et al., 2001). Лист и цвет *Paulownia* се такође користи и у медицинске сврхе. Shtereva, L. et al. (2014) сматрају да су и минимални инпути потребни за плантажно гајење ове шумске врсте, што њену производњу чини економичном. У истраживањима Поповић, Ј., Радошевић, Г. (2009) урађене су анализе хемијског састава дрвених врста *Paulownia fortunei* и *Paulownia elongata*, које су важан показатељ квалитета дрвета као сировине, како у хемијској, тако и у механичкој преради дрвета. Исти аутори су утврдили да ове две врсте имају релативно висок садржај целулозе што их квалификује као добру сировину у хемијско-прерађивачкој деловној индустрији.

Paulownia се може размножавати семеном, резницама изданака и корена, као и микропропагијом *in vitro*. Наводећи само неке предности *in vitro* методе, односно микропропагије (брзо размножавање клонова и добијање униформног садног материјала) наглашава се да је ова метода погодна за биљке које се тешко размножавају другим начинима вегетативног размножавања; користи се за дуго чување клонског материјала – криопрезервација; поступак размножавања се спроводи током целе године у лабораторијским условима; лако је преношење материјала на велике раздаљине; може се добити велики број биљака од једног почетног експлантата - производња је неограничена и без могућности заразе), онда свака рационализација исте налази оправдање у њеној примени (Ружић, Ђ., Церовић, Р., 2002).

У истраживањима на различитим *Paulownia* врстама (углавном *P. tomentosa* и *P. elongata*), методу микропропагије су успешно применили: Bergmann, В.А. (1995), Ipekci, Z. et al. (2001), Ozaslan, М. et al. (2005), Слара, D. et al. (2014), Shtereva, L. et al. (2014) и др. Истраживања су проширена и на друге области, као нпр. утврђивање генетичке стабилности микроразмножених биљака (Rout, G.R. et al., 2001).

Циљ ових истраживања је био да се у условима ограниченог коришћења комерцијалне микропропагије у нашој земљи, промовише, развије и унапреди протокол, односно ефикасан и брз систем размножавања и ширења ове, за шумарство, значајне врсте.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

2.1. Порекло биљног материјала и успостављање асептичне културе

У оквиру сарадње успостављене са расадником „PLANTO“, Марковац, Република Србија (www.planto.rs), добијене су саднице и коренове резнице *Paulownia elongata* које су засађене у стерилан земљишни супстрат. Са надземног дела садница пупољци су кренули да се развијају после двадесетак дана, док је раст изданака са коренових резница уочен тек после 45 дана. Поред тога, добијене су и зреле резнице са пупољцима скинуте са биљака у пољу.

Као почетни експлантати за успостављање асептичне културе коришће-

ни су пупољци са зрелих резница одмах по добијању материјала, затим зелене једнонодалне резнице и врхови скинути са довољно прораслих изданака (20–30 cm) са надземног дела садница, или изданака формираних са коренових резница.

У експерименту су коришћене три процедуре површинске стерилизације експлантата:

1. Стандардна процедура површинске стерилизације: 1,5–2,0 часа испирање у проточној води, 1 min у 70% етанолу, 10 min у 10% варикини и 3 пута испирање стерилном водом. Овом процедуром су стерилисани пупољци са зрелих резница.

2. Временски модификована процедура површинске стерилизације 1 : 1,5–2,0 часа испирање у проточној води, 1 min 30 sec у 70% етанолу, 15 min у 10% варикини и 3 пута испирање стерилном водом. Овом процедуром су стерилисане зелене резнице и врхови изданака.

3. Временски модификована процедура површинске стерилизације 2 : 1,5–2,0 часа испирање у проточној води, 2 min у 70% етанолу, 20 min у 10% варикини и 3 пута испирање стерилном водом. Овом процедуром су такође стерилисане зелене резнице и врхови изданака.

Пупољци и врхови изданака величине 0,5–0,8 cm, као и једнонодалне резнице су постављани на медијум Murashige, T., Skoog, F. (1962) (MS) са у mg l^{-1} : бензил аденин (BA) 2,0, индол- β -бутерна киселина (IBA) 0,5 и гиберелна киселина (GA_3) 0,1. Медијум је садржавао агар и сахарозу у концентрацији од 7 и 20 g l^{-1} , респективно.

2.2. Мултипликација *in vitro*

По успостављању асептичне културе, односно индукцији розете, изданци су мултиплицирани на MS медијуму са BA 4,0 mg l^{-1} и α -нафтил сирћетном киселином (NAA) 0,2 mg l^{-1} (Bergmann, V.A., 1995). Медијум је садржавао агар у концентрацији од 7 g l^{-1} и сахарозу у концентрацији 30 g l^{-1} . Једна супкултура је трајала 28 дана. Изданци су мултиплицирани на овом медијуму у две узастопне супкултуре са циљем да се добије довољан број *in vitro* изданака за испитивање утицаја промене хормонског састава медијума на параметре мултипликације.

По 24 униформна изданка (8 изданака \times 3 понављања) су у трећој супкултури постављани на MS медијуме различитог хормонског састава (табела 1).

Табела 1. Хормонски састав медијума за мултипликацију
Table 1. Hormonal composition used in the multiplication media

Ознаке медијума Media designation	Биљни регулатори растења (mg l^{-1}) Plant growth regulators (mg l^{-1})		
	BA	NAA	IBA
PM0	4	-	-
PM1	4	0,2	-
PM2	4	0,1	-
PM3	4	-	0,2
PM4	4	-	0,1

Медијуми су садржавали такође агар и сахарозу у концентрацији 7 g l⁻¹ и 30 g l⁻¹, респективно. Супкултура је трајала 28 дана, а мерени су следећи параметри мултипликације: индекс мултипликације, дужина осовинског и бочних изданака, али и специфичне појаве, као што су конзистенција и боја калуса, обојеност и положај листова, појава хлорозе, некрозе и др.

2.3. Ожиљавање *in vitro*, аклиматизација и адаптација

Мултиплицирани изданци су у трећој супкултури постављани на медијуме за ожиљавање различитог хормонског састава (табела 2). У фази ожиљавања коришћен је MS медијум са минералним солима смањеним на ½, органским комплексом непромењеним по MS, агаром у концентрацији од 7 g l⁻¹ и сахарозом у концентрацији 20 g l⁻¹. Праћени су следећи параметри ожиљавања: проценат ожиљавања, просечан број и дужина коренова, дужина ожиљених биљака.

Табела 2. Хормонски састав медијума за ожиљавање

Table 2. Hormonal composition used in the rooting media

Ознаке медијума Media designation	Биљни регулатори растења (mg l ⁻¹) Plant growth regulators (mg l ⁻¹)		
	NAA	IBA	GA ₃
PR1	-	1,0	0,1
PR2	1,0	-	0,1
PR3	0,5	0,5	0,1

Изданци ожиљени *in vitro* су пренешени у стаклару, посађени у стерилан земљишни супстрат (Klassmann Steckmedium - мешавина слабо разрађеног белог махунастог тресета и 25% перлита) и аклиматизовани под „mist” системом (тип „Електронски лист”, МС Company, Београд). Услови за аклиматизацију су били следећи: осетљивост „mist” сензора 25%, дужина прскања 5 s, фотосензор искључен. Процент аклиматизованих биљака утврђиван је 7 дана после изношења биљака у *ex vitro* услове.

По завршеној аклиматизацији биљке су пренешене на столове у стаклари и успешно адаптиране.

2.4. Статистичка обрада података

Добијени резултати су обрађени статистички, анализом варијансе и Duncan-овим појединачним тестом вишеструких интервала, за p < 0,05.

3. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА

Успешност успостављања асептичне културе је изражена преко следећих параметара: проценат почетних експлантата који је заражен, некротирао и индуковао розету. Највећи проценат формираних розета је добијен коришћењем врхова изданака као почетних експлантата скиданих са посађених садница, са другим и трећим начином стерилизације, односно

100% (табела 3, слика 1-А-Б-Ц).

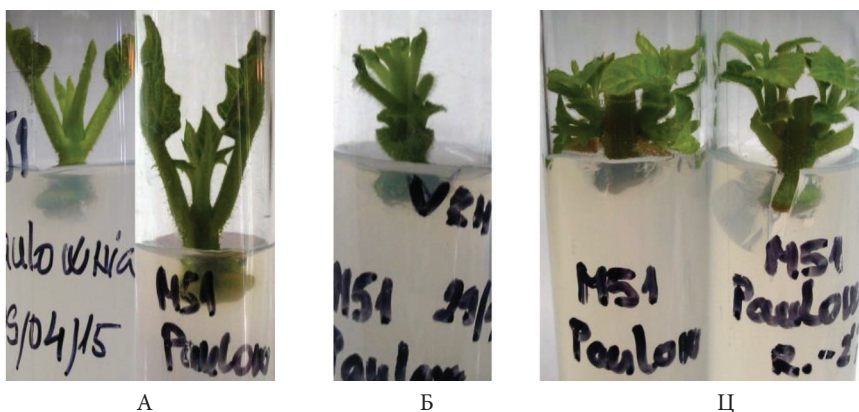
Табела 3. Успостављање асептичне културе – иницијација розете (*Paulownia elongata*)

Table 3. Establishment of aseptic culture – initiation of rosette (*Paulownia elongata*)

Начин стерилизације Way of sterilization	Тип експлантата Explant type	% заражених култура Infected cultures (%)	% потамнелих култура Darkened cultures (%)	Формирало розету (%) Formed rosette (%)
1	Пупољци са зрелих резница	54,2 a*	0,0 a	45,8 d
2	Зелене резнице једнонодалне са садница	16,7 b	0,0 a	83,3 c
	Врхови изданака са садница	0,0 d	0,0 a	100,0 a
3	Зелене резнице једнонодалне са садница	8,0 c	0,0 a	92,0 b
	Врхови изданака са садница	0,0 d	0,0 a	100,0 a

* Просечне вредности за испитиване параметре у истој колони које су обележене истим словима нису статистички значајно различите (Duncan-ов тест за $p < 0,05$)

* Mean values of investigated parameters within each column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)



Слика 1. Успостављање асептичне културе – иницијација розете *Paulownia elongata*: А – розете инициране из пупољака са зрелих резница; Б – из врхова изданака са садница и; Ц – од једнонодалних резница са садница

Figure 1. Establishment of aseptic culture – initiation of *Paulownia elongata* rosette: А – rosette initiated from buds of hardwood cuttings; B – from shoot tips from nursery trees and; C – from one-node cuttings from nursery trees

Једнонодалне зелене резнице коришћене као експлантати су такође дале висок проценат регенерације са другим и трећим начином стерилизације (83,3% и 92%, респ.). Грекси, Z. *et al.* (2001) су највећу регенерацију добили користећи управо нодалне експлантате који су такође и за Oza sl an, M. *et al.* (2005) били најбољи извор за индуковање директне органогенезе *Paulownia*. Слара, D. *et al.* (2014) добили су веома висок проценат преживљавања, односно регенерације изданака из аксиларних пупољака код хибрида *P. elongata* × *P. fortunei* (95,55%).

Највећи индекс мултипликације је добијен на медијуму са 4 mg l⁻¹ ВА и 0,2 mg l⁻¹ НАА, коју је добио и Bergmann, B.A. (1995) и која је у овим истраживањима послужила као полазна основа за варирање коришћених регулатора растења (табела 4).

Табела 4. Параметри мултипликације *Paulownia elongata* (просек) на медијумима различитог хормонског састава

Table 4. Multiplication parameters of *Paulownia elongata* (average) on the media with different hormonal composition

Ознаке медијума Media designation	Индекс мултипликације Multiplication index	Дужина осовинског изданка (cm) Length of axial shoot (cm)	Дужина бочних изданака (cm) Length of lateral shoots (cm)
PM0	3,88 b	2,24 b*	1,15 a
PM1	4,67 a	2,00 b	0,87 b
PM2	3,75 b	2,30 ab	0,88 b
PM3	2,63 c	2,15 b	0,90 b
PM4	2,88 c	2,63 a	0,92 b

* Просечне вредности за испитиване параметре у истој колони које су обележене истим словима нису статистички значајно различите (Duncan-ов тест за $p < 0,05$)

* Mean values of investigated parameters within each column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)

Основне карактеристике биљака на испитиваним медијумима, без обзира на врсту и концентрацију биљних регулатора растења, су снажни изданци са широким зеленим листовима изражене лисне нерватуре. Бочни изданци се формирају из калуса, али и дуж осовинског изданка. Поред значајне мултипликације уочава се велики број ситних зачетака пупољака у пазуху листова осовинског изданка (слика 2).

Осовински изданак се може нодално трансплантирати, а просечан број сегмената по изданку је чак износио и до 3,5 на медијуму где су добијени најдужи изданци (4 mg l⁻¹ ВА и 0,1 mg l⁻¹ ИВА).

Калус је углавном велике масе, чврст, нодуларне структуре, у основи тамно зелене боје са светло зеленим нодулама.

Снажни изданци погодни за даље умножавање, или ожиљавање указују на висок капацитет и способност вегетативног размножавања ове врсте.



A



Б

Слика 2. Изданци *Paulownia elongata* на медијуму (са у mg l⁻¹): А – ВА 4, NAA 0,2; Б – ВА 4

Figure 2. *Paulownia elongata* shoots on medium (in mg l⁻¹): A – BA 4, NAA 0.2; B – BA 4

То потврђује и веома висок проценат оживљавања и аклиматизације (100%) изданака *Paulownia* (табела 5). Највећа дужина коренова добијена је на медијумима са ИВА, а највећи број коренова на медијуму са комбинацијом NAA и ИВА (табела 5, слика 3 - А, Б, Ц).

Табела 5. Параметри оживљавања *Paulownia elongata* (просек) на медијумима различитог хормонског састава и проценат аклиматизације

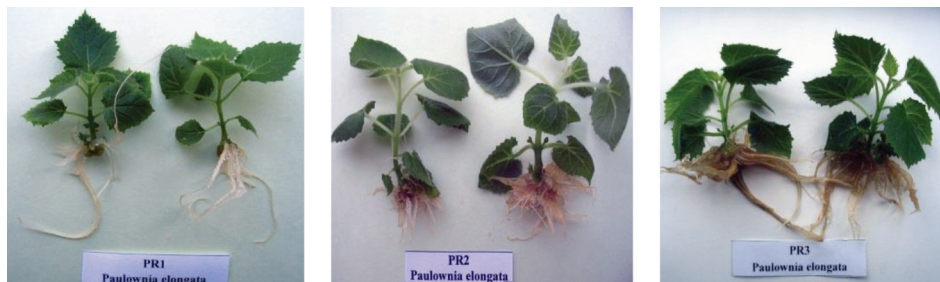
Table 5. Rooting parameters and percentage of acclimatization of *Paulownia elongata* (average) on the media with different hormonal composition

Ознаке медијума Media designation	% оживљавања % of rooting	Бр. коренова No. of roots	Дужина коренова (cm) Length of roots (cm)	Дужина оживљених биљака (cm) Length of rooted plants (cm)	% аклиматизације % of acclimatization
PR1	100,0 a	5,1 b*	3,7 a	2,3 a	100 a
PR2	100,0 a	6,0 b	2,9 b	2,5 a	100 a
PR3	100,0 a	12,5 a	2,6 b	2,4 a	100 a

* Просечне вредности за испитиване параметре у истој колони које су обележене истим словима нису статистички значајно различите (Duncan-ов тест за $p < 0,05$)

* Mean values of investigated parameters within each column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)

Ozasan, M. et al. (2005) су, такође, најбоље оживљавање *Paulownia* добили на медијуму са комбинацијом ауксина, али NAA и IAA.



А

Б

Ц

Слика 3. Ожиљени изданци *Paulownia elongata* на медијуму (са у mg l^{-1}): А – 1 IBA, 0,1 GA_3 ; Б – 1 NAA, 0,1 GA_3 ; Ц – 0,5 IBA, 0,5 NAA, 0,1 GA_3

Figure 3. Rooted shoots of *Paulownia elongata* on the media (in mg l^{-1}): А – 1 IBA, 0.1 GA_3 ; В – 1 NAA, 0.1 GA_3 ; С – 0.5 IBA, 0.5 NAA, 0.1 GA_3

Формирани коренови су били различите морфологије у зависности од врсте употребљеног ауксина, од дугачких, танких, зракасто распоређених са развијеним секундарним кореновима (слика 3 - А), кратких, танких, розе пигментисаних са великим бројем секундарних коренова (слика 3 - Б), до дебљих, тамнодрап боје, са великим бројем секундарних коренова који формирају густ прамен (слика 3 - Ц).

Без обзира на морфологију коренова и његову развијеност, аклиматизација је под „mist“ системом орошавања/измаглице, износила 100% (табела 5, слика 4).



Слика 4. Адаптиране биљке *Paulownia elongata* у стаклари
Figure 4. Adapted plants of *Paulownia elongata* in the glasshouse

Да би се смањили трошкови потребни за припрему медијума за ожиљавање Сlara, D. *et al.* (2014) препоручују аклиматизацију у супстрату Jiff у 7 посуда, односно ожиљавање изданака *ex vitro*, где су са изданцима дужине 3-5 cm добили чак 92,5% ожиљених биљака.

5. ЗАКЉУЧАК

Дугогодишња истраживања су потврдила да успех у *in vitro* регенерацији биљака зависи од контроле морфогенезе, која је условљена утицајем неколико фактора, као што су генетичка позадина/специфичност, врста експлантата, хранљиве компоненте медијума и регулатори растења, али и услови гајења биљака.

На основу спроведених истраживања могу се извести следећи закључци:

- највећи проценат формираних розета је добијен коришћењем врхова изданака као почетних експлантата скиданих са посађених садница, али су и једнонодалне зелене резнице, коришћене као експлантати, дале висок провенат регенерације (обе врсте експлантата са два начина модификоване површинске стерилизације: 1 min 30 sec у 70% етанолу, 15 min у 10% варикини и 3 пута испирање стерилном водом и 2 min у 70% етанолу, 20 min у 10% варикини и 3 пута испирање стерилном водом);
- највећи индекс мултипликације је добијен на медијуму MS са 4 mg l⁻¹ ВА и 0,2 mg l⁻¹ NAA (1 : 4,67), а дужина осовинских изданака на медијуму MS са 4 mg l⁻¹ ВА и 0,1 mg l⁻¹ IBA (2,63 cm);
- проценат оживљавања је био 100% у свим употребљеним комбинацијама, али је највећи број коренова добијен на медијуму MS ½ са комбинацијом ауксина, 0,5 mg l⁻¹ NAA, 0,5 mg l⁻¹ IBA и 0,1 mg l⁻¹ GA₃ (12,5);
- добијени резултати су показали да се ова биљна врста лако размножава *in vitro* и што је најважније аклиматизује 100%;
- разрађен протокол може бити веома користан за брзо подизање плантажа великих размера ове економски важне *Paulownia* врсте.

ЛИТЕРАТУРА

- Bergmann, B.A. (1995): Micropropagation of *Paulownia elongata*. Proceedings of 23rd Southern Forest Tree Improvement Conference, Asheville, North Carolina, p. 266.
- Клапа, Д., Фира, А., Симу, М., Васу, Л.В., Будурој, Д. (2014): Improved *in vitro* propagation of *Paulownia elongata*, *P. fortunei* and its interspecific hybrid *P. elongata* x *P. fortunei*. Bulletin UASVM Horticulture, Vol. 71. No. 1: 6-14.
- Ирекчи, З., Алтинкут, А., Казан, К., Бајровић, К., Гозукирмизи, Н. (2001): High frequency plant regeneration from nodal explants of *Paulownia elongata*. Plant Biology, Vol. 3. No. 2: 113-115.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum, Vol. 15. No. 3: 473-497.
- Ozaslan, M., Can, C., Aytekin, T. (2005): Effect of explant source on *in vitro* propagation of *Paulownia tomentosa* Steud. Biotechnology & Biotechnological Equipment, Vol. 19. No. 3: 20-26.
- Поповић, Ј., Радошевић, Г. (2009): Хемијске карактеристике врста *Paulownia fortunei* Seem. Hemsl. и *Paulownia elongata* S. Y. Hu. Шумарство бр. 3-4. УШИТС. стр. 75-80, Београд.
- Rout, G.R., Reedy, G.M., Das, P. (2001): Studies on *in vitro* clonal propagation of *Paulownia tomentosa* Steud. and evaluation of genetic fidelity through RAPD marker. Silvae Genetica, Vol.

50. No. 5-6: 208-212.

Ružić, Dj., Cerović, R. (2002): Primena mikropropagacije voćaka *in vitro* u komercijalne svrhe. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik 6p. 8, crp. 213-224.

Shtereva, L., Vassilevska-Ivanova, R., Karceva, T., Kraptchev, B. (2014): Micropropagation of six *Paulownia* genotypes through tissue culture. Journal of Central European Agriculture, Vol. 15. No. 4: 147-156.

ESTABLISHMENT / INTRODUCTION OF FAST AND EFFICIENT *IN VITRO* PROPAGATION SYSTEM OF *Paulownia elongata*

Tatjana Vujović
Đurđina Ružić
Radosav Cerović

Summary

A successful protocol for micropropagation of *Paulownia elongata* was developed at Department of Fruit Physiology of the Fruit Research Institut, Čačak. The material used for this research was obtained in the framework of collaboration with 'Planto' nursery, Markovac, Republic of Serbia.

Buds taken from hardwood cuttings of field plants, shoot tips stripped from planted nursery trees, as well as single-node green cuttings are used as initial explants for establishment of aseptic culture. Following surface sterilization with 70% ethanol for 1 min 30 sec and 10% commercial bleach for 15 min or with 70% ethanol for 2 min and 10% commercial bleach for 20 min, the highest percentage of initiated rosettes (100%) was obtained from shoot tip explants. Also, single-node green cuttings showed high regeneration ability being 83.3% and 92.0%, respectively. The highest multiplication index was obtained on Murashige and Skoog medium (MS) (1962) supplemented with 4 mg l⁻¹ BA and 0.2 mg l⁻¹ NAA (1 : 4.67), while the highest length of axial shoot was obtained on MS medium with 4 mg l⁻¹ BA and 0.1 mg l⁻¹ IBA (2.63 cm). However, shoots grown on all tested media, regardless the type and concentration of plant growth regulators, displayed very good growth characteristics and were very well developed with wide green leaves and large callus. Strong shoots suitable for further multiplication, as well as for rooting indicate high capacity and ability for vegetative propagation of this species. Percentage of rooting *in vitro* was 100% with all used combination of auxins, but the highest number of roots was obtained on MS ½ with combination of 0.5 mg l⁻¹ NAA, 0.5 mg l⁻¹ IBA and 0.1 mg l⁻¹ GA₃ (12.5). Under the 'mist' irrigation the acclimatization was 100%.

The developed protocol encourages the use of micropropagation for propagation and spreading of this important forest species in our country.