

## *In vitro* regeneracija zrelih embriona ekstrahovanih iz potpuno razvijenih i šturih zrna tritikalea ( $\times$ *Triticosecale* Wittmack)

Danijela Kondić<sup>1</sup> Desimir Knežević<sup>2</sup> Ivana Đukić<sup>1,3</sup> Fejzo Begović<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

<sup>2</sup> Poljoprivredni fakultet, Lešak, Univerzitet u Prištini (Kosovska Mitrovica), Srbija

<sup>3</sup> Institut za genetičke resurse Univerziteta u Banjoj Luci

<sup>4</sup> Školski centar Podrinje u Tuzli

### Sažetak

Pojava šturih zrna kod žitarica u osnovi podrazumjeva izostanak formiranja endosperma, s tim da je anatomska građa embriona karakteristična kao i kod normalnih zrna. Ekstrakcija embriona iz šturih zrna može biti značajna za selekciju u smislu traženja odgovora za sve oblike prekida endospermogeneze, kao i prevazilaženje problema pojave šturih zrna u hibridizaciji genotipova gdje se očekuje dobijanje genotipova sa određenim svojstvima. Regeneracija embriona iz šturih zrna može biti interesantna u traženju fizioloških i ekofizioloških odgovora na indukciju šturih zrna kod kojih je endospermogeneza prekinuta u kasnijim fazama razvoja zrna metodološki opisano kao spašavanje embriona. Posebno može biti interesantna pojava šturih zrna gdje dolazi do perioda prekida formiranja endosperma nakon inicijalnog formiranja endosperma. Cilj istraživanja bio je da se prouči mogućnost regeneracije embriona, odnosno spašavanje embriona genotipa Oskar kao perspektivnog domaćeg genotipa. Ekstrahovani embrioni uzgajali su se u uslovima *in vitro* na hranljivoj podlozi MS. Uspješnost regeneracije embriona zavisi od vrste medijuma, a limitirana je starošću embriona, odnosno momentom uvođenja u kulturu *in vitro*. Praktični aspekt kulture ekstrahovanih embriona, odnosno embriokulture vidi se i u prevladavanju dormantnosti, skraćivanju oplemenjivačkih ciklusa, prevazilaženja samosterilnog sjemena, kao i testiranju sjemena. Za embrione koji su formirali normalne biljke visine preko 15 cm, konstatovali smo da su u mogućnosti da se razviju u biljku sposobnu da klasa.

*Ključne riječi:* tritikale, embrio, *in vitro* kultura

### Uvod

Poremećaji u oplodnji i embriogenezi nastaju kao rezultat opšte zakonitosti koja je svojstvena svim vještačkim poliploidima, kao i usljed konkretnih genetičkih pojava koje nastaju kao posljedica ukrštanja različitih vrsta i rodova. Kao posljedica poremećaja u endo-

spermgenezi javljaju se različite deformacije endosperma koje se ispoljavaju u vidu smežuranosti zrna, posebno kod primarnih oktoploidnih formi tritikalea. Veću zastupljenost šturih zrna imaju kombinacije u kojima je kao majka korišćena raž, ali i iz ovih zrna uvijek je moguće uz pomoć kulture *in vitro* dobiti biljke, što pokazuje da je samo endosperm bio degenerativan. Pojava šturih zrna u klasu tritikalea je jedan od glavnih uzroka smanjenja prinosa (Shealy i Simmonds, 1973). Štura zrna podrazumjevaju zrna u kojim se nije u potpunosti formirao endosperm. Endosperm je najzastupljenije tkivo u zreloom zrnu žitarica, te je razumjevanje njegovog razvoja od posebnog značaja za poljoprivredu (Kowles i Philips, 1988). Poteškoće u proučavanju razvoja endosperma nastaju zbog specifičnih procesa u formiranju i građi endosperma kao i njegove pozicije u zrnu, odnosno i relativne nepristupačnosti endosperma za eksperimentalnu manipulaciju, posebno u ranim fazama razvoja odmah poslije oplodnje i početnim fazama embriogeneze (Goldberg i sar., 1994). Metoda kulture endosperma iz žitarica u budućnosti može se obavljati premještanjem embrija iz izolovane embrionalne kesice. Embrio može biti odvojen od endosperma nakon što je oplodena embrionalna kesica izolovana i postavljena u medijum. Dioba oplodene jajne ćelija započinje kasnije nego dioba endosperma (Bennett i sar., 1973). Razvoj embrija se dešava na račun hranljivih materija iz antipodijalnih i embriju bližih endospermnih ćelija, kao i hranljivim materijama nastalim hidrolizom parenhimskih ćelija nucelusa (Smart i O' Brien, 1983; Huber i Grabe, 1987).

### Materijal i metod rada

U kulturi ekstrahovanih zrelih embriona u *in vitro* uslovima korišteni su zreli embrioni iz potpuno razvijenih i šturih zrna ozimog tritikalea genotipa Oskar. Sterilizacija zrna tritikalea izvršena je u 2,5% natrijevom hipohloritu u trajanju 15 minuta. Zrna su po ispiranju u destilovanoj vodi prenjeta u 0,5% rastvor antibiotika na bazi penicilina u trajanju od 10 minuta, a zatim isprani u destilovanoj vodi i ponovo stavljeni u 1% rastvor natrijevog hipohlorita u trajanju od 5 minuta. Embrioni su pod binokularom ekstrahovani disekcionim iglama i postavljeni na medij. Medij korišćen za kultiviranje ekstrahovanih embriona ispitivanog genotipa Oskar bio je hranljiva podloga MS.



Sl. 1. Normalno zrno tritikalea (a) i štura zrna (b – zrna u kojima se nije u potpunosti formirao endosperm). Iz normalnih zrna (kontrola) i šturih zrna vršena je ekstrakcija embriona koji su potom postavljeni na medij u kulturi "in vitro" (desno).

*Normal grain of triticale (a) and the shrivelled grains (b - grains in which is not fully formed endosperm). Extraction of embryos from normal (control) and shrivelled grains was done, after that embryos was set on medium in culture "in vitro" (right).*

## Rezultati istraživanja i diskusija

Rezultati istraživanja predstavljeni su relativnom frekvencijom regenerisanih i degenerativnih embriona ekstrahovanih iz normalnih i šturih zrna genotipa Oskar, i to po kultivisanju i nakon subkultivacije, kao i morfološkom analizom ponašanja embriona, odnosno klijanaca tokom razvoja u kulturi *in vitro*. Frekvencija regenerisanih embriona ekstrahovanih iz normalnih i šturih zrna bila je veoma visoka, od 91,67 do 97,33% i ova razlika nije bila statistički značajna. Razlika u ponašanju embriona po uvođenju u kulturu *in vitro* između dvije analizirane grupe bila je u broju degenerisanih i zaraženih embriona, ali ove razlike nisu ocjenjene kao indikativne, budući da razlika u regenerisanim embrionima ekstrahovanih iz šturih i normalnih zrna nije bila statistički signifikantna. Međutim, razlike u regeneraciji embriona pojavile su se nakon prve subkultivacije. Naime, kod klijanaca formiranih iz embriona šturih zrna pojavio se statistički visoko značajno veliki broj degenerativnih promjena (30,21%), što je uslovalo da je broj normalno razvijenih klijanaca iz embriona šturih zrna bio statistički visoko značajano manji u odnosu na broj normalno razvijenih klijanaca ekstrahovanih iz embriona normalnih zrna. Interesantno je konstatovati i činjenicu da se prilikom kultivacije i subkultivacije kod embriona ekstrahovanih iz šturih zrna pojavio relativno visok procenat zaraženih embriona (8,33%).

Tab. 1. Frekvencija razvoja i degenerativnih promjena kod embriona ekstrahovanih iz normalnih i šturih zrna genotipa Oskar

*Frequency of development and degenerative changes in the embryos extracted from normal and shrivelled grains of genotype Oskar*

Kultivisanje	Embrioni ekstrahovani iz		t test
	normalna zrna (%)	štura zrna (%)	
normalan razvoj	97,33 ± 1,65	91,67 ± 3,56	1,413 <sup>nz</sup>
degenerativne promjene	3,36 ± 2,32	0,00	
zaraženo	0,00	8,33 ± 3,56	
Subkultivacija I			
normalan razvoj	91,22 ± 3,87	61,67 ± 6,27	4,010**
degenerativne promjene	9,81 ± 3,65	30,21 ± 5,91	2,936*
zaraženo	0,00	8,33 ± 3,56	

Činjenica da je 91,67% imalo normalan razvoj po kultivisanju kao i činjenica da 61,67% klijanaca po subkultivaciji dalo normalno razvijene biljke u kulturi *in vitro* jasno potvrđuje uspješnost tehnike spašavanja embriona ekstrahovanih iz zrna sa prekinutom endospermgenozom.

Sekvence regeneracije, odnosno rasta i razvoja ekstrahovanih embriona u kulturi *in vitro* mogu se opisati sljedećim koracima:

I – Razvoj embriona prati pojava korijena sa uočljivim formiranjem kalipre i zone korjenskih dlačica. Pojavu koleoptile prati inicijalni razvoj stabaoaceta. Razlika u ponašanju embriona ekstrahovanih iz normalnih i šturih zrna nije uočljiva sem varijacije u broju probuđenih i degenerisanih ili zaraženih klijanaca što je bilo na nivou koji se može tolerisati, odnosno, nije signifikantan (Sl. 2).

**II – Fenofaza nicanja.** Razvoj korijena i stabaoaceta su karakteristični za vrstu. Razvoj korijena je 2 do 3 puta duži od visine stabaoaceta koje se nalazi u fazi pucanja koleoptile i pojave listova. Razlike u razvoju klijanaca formiranih iz embriona ekstrahovanih iz normalnih i šturih zrna nisu evidentirane na indikativnom nivou (Sl. 3).

Embrioni iz normalnih zrna  
*Embryo from normal grain*



Embrioni iz šturih zrna  
*Embryo from shrivelled grain*



**Sl. 2.** Razvoj embriona iz normalnih i šturih zrna prema sekvenci I  
*The development of embryos from normal and shrivelled grains according to sequence I*



**Sl. 3.** Razvoj embriona iz normalnih i šturih zrna prema sekvenci II  
*The development of embryos from normal and shrivelled grains according to sequence II*

**III – Svi klijanci formirani iz embriona ekstrahovanih iz normalnih i šturih zrna koji su prošli fazu nicanja imali su usaglašen i normalan razvoj do visine 18 cm (limitirano visinom epruvete, Sl. 4). U konačnom zapažanju može se konstatovati da dinamika porasta biljaka razvijenih iz embriona šturih zrna bila je saglasna razvoju biljaka kontrolne varijante (biljke razvijene iz embriona ekstrahovanih iz normalnih zrna).**

**Ponik embriona iz normalnih zrna**  
*Seedling from embryo extracted from normal grain*



**Ponik embriona iz šturih zrna**  
*Seedling from embryo extracted from shrivelled grain*



Sl. 4. U razvoju ponika iz ekstrahovanih embriona normalnih i šturih zrna nisu uočene razlike koje bi bile indikativne za ocjenu razlika u njihovoj vitalnosti i razvoju.  
*In developing of seedlings obtained from extracted embryos from normal and shrivelled grains were not observed differences which could be indicative for evaluation of differences in their vitality and development.*

#### IV – Poremećaji u razvoju ekstrahovanih embriona u kulturi *in vitro*

U kultivaciji i subkultivaciji ekstrahovanih embriona pojavile su se degenerativne promjene koje se uglavnom mogu grupisati u dvije sljedeće grupe:

- Razvoj embriona je prekinut i različita tkiva su formirala kalus, tako da je konačan ishod formirana manja ili veća masa kalusa neidentifikovanog porijekla (Sl. 5). Detaljna ponašanja razvoja kalusa ili organa koji su se inicijalno održali nije bio predmet daljih posmatranja.
- Kod pojedinih embriona bez obzira na porijeklo došlo je do normalnog razvoja stabaceta s tim da je razvoj korijena u potpunosti izostao (Sl. 6). Moguća indukcija rizogeneze subkultivacijom na medij za indukciju razvoja korijena ostaje otvoreno pitanje.

Embrioni iz normalnih zrna  
*Embryo from normal grain*



Embrioni iz šturih zrna  
*Embryo from shrivelled grain*



Sl. 5. Formiranje kalusnog tkiva kao posljedice degenerativnih promjena u razvoju ekstrahovanih embriona u kulturi "in vitro".

*The formation of callus tissue as a result of degenerative changes in the development of the extracted embryos in culture "in vitro".*



Sl. 6. Kod pojedinih ekstrahovanih embriona u kulturi "in vitro" došlo je samo do razvoja plumule, a izostalo je formiranje korijena.

*In some of the extracted embryos in culture "in vitro" only plumula has been developed, and there was no root formation.*

## Zaključak

Ekstrakcija i uvođenje u kulturu embriona iz šturih i potpuno razvijenih zrna tritikalea pokazuju zadovoljavajući nivo regeneracije, odnosno normalan razvoj biljaka. Spašavanje embriona u posebnim uslovima hibridizacije u cilju proučavanja njihove genetičke konstitucije eksperimentalno je u potpunosti izvodljivo.

Broj razvijenih biljaka u kontrolnoj varijanti bio je za 30% veći, i razlika je bila statistički značajna. Na osnovu broja normalno razvijenih biljaka iz embriona ekstrahovanih iz normalnih i šturih zrna jasno možemo zaključiti da *in vitro* tehnika regeneracije embriona kod zrna sa narušenom endospermigenezom može biti uspješno korišćena u istraživanju gdje za to postoji potreba.

## Literatura

1. Bennett, M. D., Rao, M. K., Smith, J. B., Bayliss, M. W. (1973): Cell development in anther, the ovule, and the young seed of *Triticum aestivum* L. var. Chinese Spring. Phil. Trans. Royal Soc., Lond. B. 66: 39-81.
2. Goldberg, R. B., de Paiva, G., Yadegari, R. (1994): Plant embryogenesis: Zygote to seed. Science. 266: 605-614.
3. Huber, A. G., Grabe, D. F. (1987): Endosperm morphogenesis in wheat: transfer of nutrients from the antipodal to the lower endosperm. Crop Sci. 27: 1248-1252.
4. Kowles, R. V., Philips, R. L. (1988): Endosperm development in maize. Int. Rev. Cytol. 112: 97-136.
5. Shealy, H. E., Simmonds, D. H. (1973): The early developmental morphology of the triticale grain. Proceedings of the IV International Wheat Genetic Symposium Agricultural Experimental Station, Columbia, Miss. United States: 265-270.
6. Smart, M. G., O'Brien, T. P. (1983): The development of the wheat embryo in relation to the neighboring tissues. Protoplasma, 114: 1-13.

## *In Vitro* Regeneration of Mature Embryos Extracted from Fully Developed and Shrivelled Grains of Triticale (× *Triticosecale* Wittmack)

Danijela Kondić<sup>1</sup> Desimir Knežević<sup>2</sup> Ivana Đukić<sup>1,3</sup> Fejzo Begović<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, University of Banja Luka

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Lešak, University of Priština (Kosovska Mitrovica), Serbia

<sup>3</sup>Genetic Resources Institute, University of Banja Luka

<sup>4</sup>School center Podrinje in Tuzla

## Summary

The appearance of shrivelled grain of cereals basically implies the absence of endosperm formation, taking into consideration that embryos has characteristic anatomy as in the normal grain. Extraction of embryos from shrivelled grains might be significant for breeding in order to get an answer of endosperm genesis interruption, as well as overcoming problems of shrivelled grain appearance in the genotypes hybridization where is expected appearance of genotypes with certain properties. Regeneration of embryos from the shrivelled grain could be of interest in seeking the physiological and eco-physiological responses to the induction of shrivelled grain where endosperm genesis is interrupted in the late stages of grain development. This process is known as embryo

rescue. It could be particularly interesting shrivelled grain appearance where is noticeable interruption of endosperm formation after the initial formation of endosperm. The aim of this study was to investigate the possibility of embryos regeneration, meaning the rescue of embryos of genotype Oskar, which represent highly perspective domestic genotype. The extracted embryos were grown *in vitro* on MS nutrient medium. The success of regeneration of the embryo depends on the type of media, and is limited by the age of the embryo or the moment of introduction into the culture *in vitro*. Significance of the embryos culture extraction is in overcoming dormancy, shortening the breeding cycle, overcoming sterile seeds and seed testing. For embryos that formed normal plant with height over 15 cm, we concluded that they are able to develop a plant that bring spikes.

*Key words:* triticale, embryo, *in vitro* culture

Danijela Kondić

*E-mail Address:*

*danijela.kondic@agrofabl.org*