

In vitro конзервација принова кромпира
(*Solanum tuberosum* L.) у Банци гена Републике Српске

Мирела Кајкут Зељковић¹, Данијела Кондић², Гордана Ђурић^{1,2}

¹Институт за генетичке ресурсе, Универзитет у Бањој Луци, Република Српска, БиХ

²Пољопривредни факултет, Универзитет у Бањој Луци, Република Српска, БиХ

Сажетак

Двије принове кромпира (Гламочки и Рогатички) у Банци гена Републике Српске су коришћене за увођење у *in vitro* културу. Као експлантат је коришћена клица кртоле кромпира. Послије процедуре површинске стерилизације, експлантати су инокулисани на MS подлогу са 3% сахарозом без хормона. Развој експлантата јепраћен кроз 5 седмица, а потом је извршено издвајање преживјелих експлантата. Број преживјелих експлантата код принове Гламочки износио је 70%, док је код принове Рогатички износио 40%. Развијени експлантати су коришћени за наредни пасаж у трајању од 5 седмица, након чега су микропропагацијом пренесени на нову MS подлогу са 3% сахарозом и хормонима ВАР и ИВА. Након 5 седмица, извршено је мјерење дужине прираста и утврђивање броја кртола. Утврђено је да је принова Гламочког имала просјечну дужину прираста од 12,24 cm, док је принова Рогатичког имала просјечну дужину прираста од 7,92 cm. Број развијених кртола по прирасту код принове Гламочки износио је 1,81 а код принове Рогатички је износио 1,21.

Кључне ријечи: MS подлога, Гламочки, Рогатички, експлантат

Увод

In vitro конзервација представља најповољнији начин умножавања, чувања и производње здравог материјала кромпира с обзиром да конзервација путем сјемена није изводљива због изражене хетерозиготности (Reed, 2001 *op cit.* Јововић, 2013). Јововић (2013) наводи да конзервација културом ткива омогућава јефтиније чување гермплазме у заштићеним условима и омогућава безбједну и лаку међународну дистрибуцију биљног материјала према стандардима фитосанитарне контроле. Главни недостатак ове методе конзервације је губитак гермплазме усљед људске грешке или случајном контаминацијом узорака. Као други главни недостатак чувања кромпира у форми културе ткива је појава спонтаних мутација које се дешавају у *in vivo* условима, али чија појава може бити учесталија у *in vitro*, у дугом периоду чувања у условима успореног раста (Јововић, 2013). Активности на очувању биљних генетичких ресурса у Републици Српској спроводе се кроз Програм очувања биљних генетичких ресурса (Ђурић и сар., 2012). У оквиру Програма, формирана је Радна група за индустријске биљке чији је задатак спровођење различитих активности у циљу очувања аутохтоних генотипова индустријских биљака од потпуног губитка. Наведене активности се реализују кроз инвентаризацију, колекционисање, карактеризацију и конзервацију. Већи дио територије Републике Српске је инвентарисан, а започете су активности у циљу конзервације принова. С обзиром да је кромпир најчешће конзервисан у *on farm* систему, овим истраживањем започете су активности на успостављању *in vitro* колекција кромпира у Банци гена Републике Српске.

Материјал и методе рада

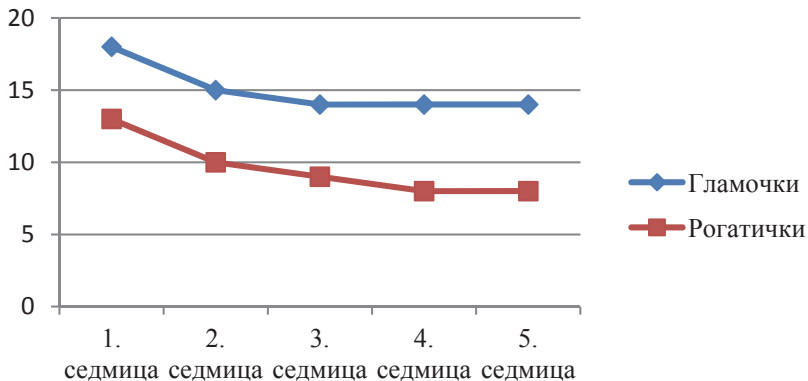
Принове кромпира Рогатички и Гламочки инвентарисане су на територији општине Рибник, а колекционисане су кртоле и донесене у Банку гена Републике Српске. Кртоле су након инспекције и евидентирања у базу података, припремљене за увођење у *in vitro* културу. Са кртола су одстрањене примјесе земље, након чега су кртоле испране дестилованом водом. Потом су исјечене клице кртоле кромпира и искоришћене као експлантат за увођење у културу *in vitro*. Експлантати су потом површински стерилисани, испирањем у текућој

води у трајању од 20 минута уз додатак течног сапуна и Tween-a 20, а потом у 70% етанолу у трајању од 1 минута. Након тога, експлантати су пренесени у 10% раствор NaClO у трајању од 20 минута и потом потопани у стерилну воду 3 пута по 10 минута. Површински стерилисан материјал је испран водом и пренесен стерилном пинцетом на стерилну површинуна даљу обраду: скраћивању (одсјецању) резног мјеста гдје је пупољак био одсјечен прије површинске стерилизације (на резним мјестима NaClO продире и оштећује ткиво). Резом је одбачено 2-5 mm експлантата од претходне резне површине. Овако припремљени експлантати двају принова су инокулисани у епрувету са MS подлогом (Murashige&Skoog, 1962) са 3% сахарозом без хормона. Укупно је уведено по 20 клица обје принове кромпира. Уведене принове су биле изложене режиму 8 h тама и 16 h свијелто, при температури од 22-25°C. Након пет седмица, преживјели и развијени експлантати принова су процедуром микропропагације умножени и пренесени на нову MS подлогу са 3% сахарозом гдје су провели такође пет седмица у истом топлотно-свјетлосном режиму. Након тога, примјеном поступка микропропагације, 30 бочних пупољка од сваке принове је инокулисано на MS подлогу са 3% сахарозом која је садржавала 2mg/l ВАР(6-бензил-амино-пурин) и 0,5 mg/l ИВА (индол-3-бутерна киселина) гдје су провели пет седмица. Из сваког експлантата пупољка се развио по један прираст, а на прирастима су се формирале једна или више кртола, а било је и прираста на којима се кртоле нису формирале. Након пет седмица мјерена је дужина прираста по експлантату и утврђиван је број формираних кртола на прирастима, за које су утврђене средње вриједности и припадајуће мјере варибалитета, а тестирање значајности разлика просјечних вриједности извршено је примјеном Студентовог t теста. По завршетку анализа преостале принове у култури су подјељене у двије групе. Прва је смјештена у краткорочни систем конзервације: 8h тама и 16h свијелто, а друга у средњерочни систем конзервација при температури од 4°C, 24 h тама.

Резултати и дискусија

Принове Гламочки и Рогатички кромпир су уведене на MS подлогу са 3% сахарозом без хормона како би се добио материјал за даљну микропропагацију. Првих пет седмица праћен је степен преживљавања експлантата двају принова. У првој седмици степен преживљавања експлантата је износио 90% код принове Гламочки, а

код принове Рогатички 65%. У другој седмици степен преживљавања експлантата је износио 75% код принове Гламочки, а код принове Рогатички 50%. У трећој седмици степен преживљавања експлантата код принове Гламочки је износио 70%, док је код принове Рогатички износио 45%. У четвртој и петој седмици, степен преживљавања експлантата принове Гламочки остао је 70%. Код принове Рогатички степен преживљавања експлантат у четвртој и петој седмици је износио 40% (Граф. 1).



Граф. 1 Динамика преживљавања експлантата принова кромпира Гламочки и Рогатички у првих 5 седмица у *in vitro* условима

Survival dynamic of accession explants at the Glamočki and Rogatički potato in the first 5 weeks into in vitro conditio

Евидентно је да је принова Гламочки имала већи степен преживљавања у односу на принову Рогатички. Након пет седмица преживјели експлантати принова су поступком микропропагације умножени тако што је по 30 бочних пупољака од обје принове инокулисано на нову MS подлогу са 3% сахарозом која је садржавала хормоне ВАР и ИВА. Праћен је раст и развој прираста на експлантатима, као и формирање кртола током пет седмица. Из сваког експлантата пупољка, развио се по један прираст. На прирастима су формиране једна или више кртола, а било је и прираста на којима кртоле нису формиране. У табели 1 дати су подаци о просјечној дужини по прирасту и просјечном броју кртола по прирасту. Прирасти принове Гламочки имали су просјечну дужину од 12,24 cm, док су прирасти принове Рогатички имале просјечну дужину од 7,92 cm.

Просјечан број развијених кртола по прирасту код принове Гламочки износио је 1,81 а код принове Рогатички износио је 1,21.

Таб. 1. Дужина прираста експлантата и броја кртола по прирасту код принова Гламочког и Рогатичког кромпира
Length of shoots by explants and number of tubers by shoot at accessions of Glamočki and Rogatički potato

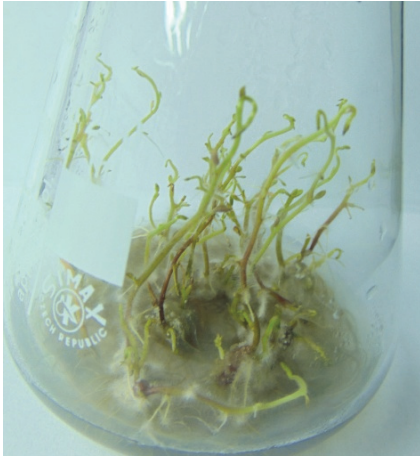
	Просјечна дужина по прирасту [cm] <i>Average length of shoots</i>	Просјечан број кртола/прирасту <i>Number of tubers/shoot</i>
	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
Гламочки кромпир <i>Glamočki potato</i>	12,24 \pm 0,40	1,81 \pm 0,20
Рогатички кромпир <i>Rogatički potato</i>	7,92 \pm 0,44	1,21 \pm 0,10
t	7,29**	2,58*

*статистички значајна разлика ($p < 0,05$), ** статистички високо значајна разлика ($p < 0,01$); у складу са Студентовим t –тестом

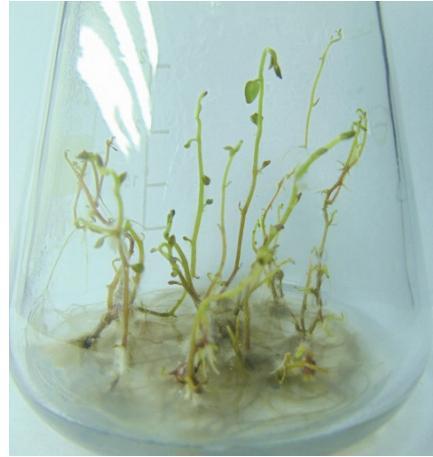
* *Statistically significant difference ($p < 0.05$)*, ** *Statistically significant difference ($p < 0.01$); in accordance with Student t-test*

Просјечна дужина прираста експлантата принове Гламочки (12.25 \pm 0.40 cm) је статистички високо значајно већа ($t=7.29^{**}$) од дужине прираста експлантата принове Рогатички (7.92 \pm 0.44 cm). Од по 30 испитаних експлантата кромпира оба типа, њих 21 је произвело кртоле код принове Гламочки, а 19 код принове Рогатички. Код експлантата који су произвели кртоле и које су кориштене у анализи, принова Гламочки је дала статистички значајно већи ($t=2.58^*$) број кртола по прирасту (1.81 \pm 0.20) у односу на принову Рогатички (1.21 \pm 0.10).

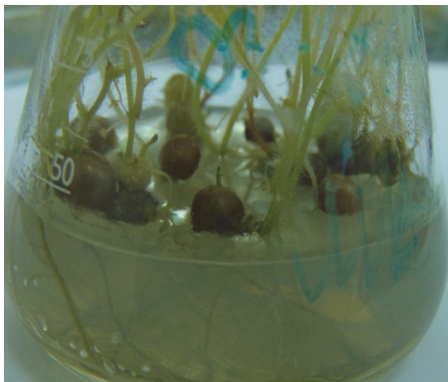
Развој коријена код обје принове био је уједначен. Добијени резултати показују да је већи степен развоја експлантата приликом увођења у културу, након првог и другог пасажа у којем је праћена дужина прираста и број формираних кртола забиљежен код принове Гламочког кромпира у односу на принову Рогатичког кромпира. За потребе конзервације у банци гена неопходан је материјал који је без оштећења и контаминација како би се упутио у краткорочну, средњерочну или дугорочну конзервацију. Овим истраживањем је добијен здрав материјал без видљивог присуства проузроковача



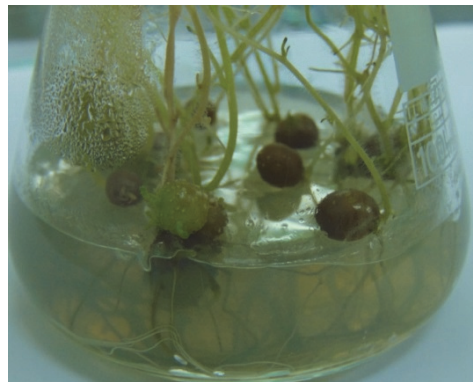
Сл. 1. Принове Гламочког кромпира
Accessions of Glamočki potato



Сл. 2. Принова Рогатичког кромпира
Accessions of Rogatički potato



Сл. 3. Формиране кртоле код
Гламочког кромпира
Formed tubers at Glamočki potato



Сл. 4. Формиране кртоле код
Рогатичког кромпира
Formed tubers at Rogatički potato

болести у *in vitro* условима које је упућен у краткорочну а потом у средњерочну конзервацију. Претходна истраживања су показала да се формирање кртола не може десити на основној MS подлози што је у овом истраживању потврђено, већ само на оној која садржи додаток хормона као што су кинетин, ВАР, GA₃, ИВА (Ноге, 2010; Gami et al., 2013; Момена et al., 2014;). Такође, велику улогу у процесу формирања кртола имају концентрација сахарозе и свјетлосни режим. У свом

истраживању Abd Elaleem et al. (2015) utvrdili su da eksplantati koji su bili inokulisani na podloge koja je sadržavala veći procenat saharoze i bila izložena tami 24 časa dali su najveći broj razvijених кртола. Микропропагација и микротуберизација кромпира се користи не само у сврхе конзервације гермплазме већ и за производњу здравих биљака и здравог сјеменског материјала (Gopal et al., 2004; Kumlay et al., 2014;). Као што је наведено добијен је материјал на којем нема видљивих знакова присуства проузроковача болести, али због будућег рад и производње здравствено исправног сјеменског материјала потребно је извршити тестирање на одређене проузроковаче болести примјеном DAS ELISA теста и молекуларних метода. С тим у вези, дио добијеног материјала је складиштен у систем краткорочне конзервације при свјетлосно температурним условима 22-25°C, 8 h тама и 16 h свјетло, док је друга половина складиштена у системе средњерочне конзервације при свјетлосно температурним условима 4°C, 24 h тама.

Закључак

Увођењем принова кромпира у културу ткива започета је и *in vitro* конзервација у Банци гена Републике Српске. Утврђено је да је принова Гламочки имала већи степен преживљавања, дуже прирасте и већи број кртола по прирасту у односу на принову Рогатички кромпир, док је развој коријена код обје принове био је уједначен. Увођењем принова Гламочног и Рогатичког кромпира у *in vitro* културу, добијен је полазни материјал за краткорочну, средњерочну и дугорочну конзервацију, карактеризацију, те за добијање безвирусног материјала. У будућим истраживањима потребно је испитати утицај различитих режима конзервације, различитих концентрација хормона на процес формирања кртола. Производњом кртола у *in vitro* условима које су ослобођење од болести и штеточина треба да се започне систем преношења тј аклиматизације сјеменског материјала у *in vivo* систем. На тај начин ће се здрав садни материјал вратити у *on farm* систем конзервације.

Захвалница

Ово истраживање је суфинансирано од стране Министарства науке и технологије Републике Српске кроз пројекат "Развој протокола за *in vitro* конзервацију биљних генетичких ресурса" који је потписан између Министарства науке и технологије Републике Српске и Института за генетичке ресурсе Универзитета у Бањој Луци, уговор број 19/6-020/964/11.

Литература

- Abd Elaleem, K.G., Modawi, R.S. & Khalafalla, M.M. (2015). Micro tuber induction of two potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties namely, Almera and Diamant. *International Research Journal of Biological Science*, 4(3), 84-89.
- Gami, R.A., Parmar, S.K., Patel, P.T., Tank, C.J., Chauhan, R.M., Bhaduria, H.S. & Solanki, S.D. (2013). Microtuberization, minitubers formation and in vitro shoot regeneration from bud sprout of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar K. Badshah. *African Journal of Biotechnology*, 12(38), 5640-5647.
- Gopal, J., Chamail, A. & Sarkar, D. (2004). In vitro production of microtubers for conservation of potato germplasm: Effect on genotype, abscisic acid, and sucrose. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40(5), 485-490.
- Hoque, M.E. (2010). In vitro tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Omics Journal*, 3(1), 7-11.
- Ђurić, G., Radun, M., Todorović, V., Kondić, D., Pećanac, D., Jovanović-Cvetković, T., Mandić, D., Pašalić, N. & Radić, V. (2012). Implementation of the programme for conservation of plant genetic resources in the Republic of Srpska from 2009 to 2012. *Agroznanje (Agroknowledge)*, 13(4): 563-571.
- Јововић, З., Стешевић, Д., Меглич, В. и Долничар, П. (2013). *Старе сорте кромпира у Црној Гори*. Подгорица: Универзитет Црне Горе, Биотехнички факултет.
- Kumlay, A.M., Arslan, N. & Kaya, C. (2014). Factors affecting microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) on in vitro conditions. *Anadolu Journal of Agriculture Sciences*, 29(2), 154-165
- Момена, К., Адеба, Р., Мехрај, Н., Јамал Уддин, А.Ф.М., Ислам, С. & Рахман, Л. (2014). In vitro Microtuberization of Potato

(*Solanum tuberosum* L.) cultivar through sucrose and growth regulator. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*, 2(1), 76-82.

Murashige, T.&Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Примљено: 07. октобар 2015.

Одобрено: 15. децембар 2015.

In vitro Conservation of Potato (*Solanum tuberosum* L.)
Accessions in the Gene Bank of Republic of Srpska

Mirela Kajkut Zeljković¹, Gordana Đurić^{1,2}, Danijela Kondić²

¹*Genetic Resources Institute, University of Banja Luka, Republic of Srpska, BiH*

²*Faculty of Agriculture, University of Banja Luka, Republic of Srpska, BiH*

Abstract

Two accessions of potato (Glamočki and Rogatički) were used for the *in vitro* culture introduction in the Gene Bank of the Republic of Srpska. As explants for introduction are used germs of potato tubers. After surface sterilization, explants were inoculated on MS medium with 3% sucrose without hormones. Development of the explants was followed by five weeks and then were done selecting of survived explants. Number of survived explants was 70% for accessions of Glamočki potato, and 40% for Rogatički potato. Developed explants were used for next passage to period of 5 weeks and after that by micropropagation procedure transferred to MS medium with 3% sucrose and hormones BAP and IBA. After 5 weeks measuring of length of shoots and determining of tubers number was performed. It was found that accessions of Glamočki potato had an average length of 12,24 cm of shoot while accessions of Rogatički potato had an average length 7,92. Average number of tubers per accession Glamočki potato had 1,81 while Rogatički had 1,21.

Key words: MS medium, Glamočki, Rogatički, explant

Mirela Kajkut Zeljković
E-mail address: mirela.kajkut@griunibl.rs.ba

Received: October 7, 2015
Accepted: December 15, 2015