

FIZIOLOŠKE KARAKTERISTIKE RASTENJA PŠENICE (*Triticum aestivum* L.) U USLOVIMA IN VITRO

Jovana Momčilović, Dragana Jakovljević, Milica Kanjevac, Biljana Bojović¹

Izvod: Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita efekat različitih medijuma na razviće *in vitro* kulture klijanaca pšenice (*Triticum aestivum* L.). Efekat koji tip medijuma (Murashige i Skoog – MS, i Gamborg – B₅) ostvaruje na *in vitro* kulturu pšenice evaluiran je kroz merenje dužine korena i izdanaka, sveže i suve mase, kao i određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata (hlorofila *a*, hlorofila *b* i karotenoida). Dobijeni podaci ukazuju da MS podloga ostvaruje bolje efekte na rasteње i razviće klijanaca pšenice, obzirom da je veća dužina izdanaka, uz istovremeno veće vrednosti sveže mase i niže vrednosti dužine korena, zabeležena na klijancima sa ovog tipa podloge. Dodatno, veća koncentracija hlorofila *b* i niža koncentracija karotenoida izmerena je u listovima pšenice uzgajane na MS podlozi. Može se zaključiti da je za uspostavljanje početne *in vitro* kulture pšenice pogodnija MS u poredjenju sa B₅ podlogom.

Ključne reči: rasteње, *in vitro*, *Triticum aestivum*, hlorofil

Uvod

Zahvaljujući adaptibilnosti i širokom arealu gajenja, pšenica je osnovna namirnica velikog dela svetske populacije (Aćin, 2016). Rasprostranjena je gotovo u celom svetu što se dovodi u vezu sa polimorfizmom, kao i postojanjem jarih i ozimih formi. Poreklom je iz Azije i južnih delova Evrope, odakle se proširila i na ostale delove sveta. Taksonomski, pšenica pripada familiji Poaceae i rodu *Triticum* u okviru koga se razlikuje više vrsta i varijeteta (Jovović i sar., 2017). Međutim, bez obzira na veliki broj vrsta, u ljudskoj ishrani i proizvodnji su najzastupljenija vrsta *Triticum aestivum*, pri čemu se godišnje u proseku proizvede oko 2.500.000 tona hlebne pšenice (Miroslavljević i sar., 2019). Od ukupne proizvodnje, za ishranu se koristi približno oko dve trećine, dok se preostala trećina najčešće koristi za ishranu životinja ili kao neprehrambeni proizvod (Đurić i sar., 2020). Savremena istraživanja ukazuju da površine pod pšenicom iznose između 550.000 i 600.000 ha (Miroslavljević i sar., 2019). Poslednjih godina istraživanja su posebno usmerena na ispitivanje lekovitih efekata žitarica. Listovi pšenice sadrže visoku koncentraciju hlorofila, pri čemu sadržaj ovih fotosintetskih pigmenata zavisi od uslova kultivacije (Bojović i Stojanović, 2005).

¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija (biljana.bojovic@pmf.kg.ac.rs)

Metoda kulture tkiva *in vitro* podrazumeva gajenje i umnožavanje ćelija, tkiva ili organa na sterilnoj hranljivoj podlozi (medijumu) i u kontrolisanim uslovima. Primena kulture tkiva ima brojne pogodnosti u odnosu na uslove kultivacije na ogleđnim poljima. Zahvaljujući totipotentnosti biljnih ćelija, *in vitro* kultura biljaka može da se primeni za gotovo svaku biljnu vrstu, a sam postupak primene kulture *in vitro* osigurava brz proces dobijanja velikog broja biljaka identičnih po stepenu razvića i genetičkom potencijalu vrste (Vuksanović, 2019). Apsorpcija i konverzija svetlosne energije u hemijsku, uz adekvatnu dostupnost mineralnih elemenata, osnova su nenarušenog funkcionisanja procesa rastenja i razvića biljaka. *In vitro* kultura biljaka se uspešno uspostavlja jedino u prisustvu odgovarajuće koncentracije nutrijenata, a kako ne postoji jedinstveni medijum koji će omogućiti održavanje bilo kog tipa kulture tkiva, za svaki vid kulture se najpre mora ustanoviti odgovarajući medijum (Jakovljević, 2020). Cilj ovog rada bio je ispitivanje uticaja dva različita medijuma – Murashige Skoog (MS) i Gamborg (B₅) na rasteenje, razviće i koncentraciju fotosintetičkih pigmenta pšenice u *in vitro* uslovima.

Materijal i metode rada

Za potrebe eksperimenta korišćena su semena *T. aestivum* dobijena iz komercijalnih izvora. Sva semena korišćena u radu su neposredno pre postavljanja na medijum površinski sterilisana 70% rastvorom etanola u trajanju od 2-3 minuta. Nakon površinske sterilizacije, semena su sterilisana korišćenjem 4% rastvora natrijum-hipohlorita (NaClO) sa 5-9 g aktivnog hlora/l u trajanju od 25 minuta u cilju uklanjanja epifitske mikroflora. Pre procesa zasejavanja semena su ispirana nekoliko puta sterilnom destilovanom vodom. Ovako pripremljena semena su pod aseptičnim uslovima preneti na hranljivu podlogu.

Tokom istraživanja korišćene su dve podloge i to standardna Murashige Skoog (MS) i Gamborg (B₅) hranljiva podloga (Murashige i Skoog 1962; Gamborg i sar., 1968). Neposredno pre zasejavanja hranljive podloge su sterilisane u autoklavu na temperaturi od 120°C u trajanju od 20 minuta. pH vrednost medijuma podešena je na 5.7-5.8 jedinica upotrebom pH-metra. Instrumenti korišćeni za manipulaciju semenima kao i ostalo posuđe korišćeno u radu sterilisano je u suvom sterilizatoru na temperature 160-180 °C u trajanju od 1h i 30 minuta.

In vitro kulture gajene su u komori za rast biljaka u trajanju od mesec dana, na temperaturi 23 ± 2 °C i vlažnosti vazduha od 60%. Kulture su gajene u uslovima dugog dana (16h svetlost/8h mrak), pri čemu su kao izvor svetlosti korišćene fluorescentne sijalice bele svetlosti i gustine svetlosnog fluksa od 50 μmol s⁻¹ m. Nakon 4-5 nedelja rasta i razvića u kulturi, vršena su merenja dužine korena i izdanaka, kao i sveže i suve mase biljnog materijala. Sadržaj hlorofila i karotenoida određivan je spektrofotometrijski (Bojović i Stojanović, 2005), a izračunavanje koncentracije hlorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida vršeno je korišćenjem formula prema Wellburn (1994). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna merenja ± standardna greška.

Rezultati istraživanja i diskusija

Efekat medijuma na dužinu korena i izdanaka *T.aestivum*

Efekat primenjenih medijuma na rastenje i razviće pšenice utvrđivan je merenjem dužine korena i izdanaka nakon mesec dana gajenja u *in vitro* uslovima (Tabela 1). Iz prikazanih rezultata se uočava da dužina korena kod pšenice varira u zavisnosti od primenjenog medijuma. Najveća dužina korena (14,93 mm) izmerena je kod pšenice gajene na B₅ medijumu, dok je dužina korena kod pšenice gajene na MS medijumu iznosila 11,40 mm. Iz prikazanih rezultata uočava da je najviša vrednosti dužine izdanka (6,79 mm) izmerena kod pšenice gajene na MS medijumu. Dostupna forma azota direktno utiče na prinos biljaka (Golcz i sar., 2006; Biesiada i Kus, 2010), jer je azot esencijalni makroelement neophodan za rastenje i razviće biljaka. Poznato je da je ovaj element biljke usvajaju u nitratnoj i amonijačnoj formi. Izraženiji efekat na izduživanje korena može imati nitratna forma azota (KNO₃) u poređenju sa rastenjem na medijumu koji kao izvor azota sadrži kombinaciju nitratne i amonijačne forme (KNO₃+NH₄NO₃) kao što je slučaj sa MS medijumom (Liu i sar., 2020).

Tabela 1. Efekat medijuma na dužinu korena i izdanaka *T.aestivum*

Table 1. Effect of medium on the root and shoot length of *T. aestivum*

Medijum <i>Medium</i>	Dužina korena (cm) <i>Root length (cm)</i>	Dužina izdanka (cm) <i>Shoot length (cm)</i>
Murashige i Skoog	11,40 ± 0,96	6,79 ± 0,86
Gamborg B5	14,93 ± 0,98	5,43 ± 0,64

Efekat medijuma na svežu i suhu masu *T.aestivum*

Izmerene vrednosti sveže i suve mase *T.aestivum* su značajno varirale u zavisnosti od primenjenog medijuma (Tabela 2), a dobijene vrednosti su u opsegu od 0,205 do 0,324 g za svežu, odnosno od 0,091 do 0,089 g za suhu masu. Iz rezultata se može videti da su vrednosti sveže i suve mase pšenice gajene na MS medijumu nešto više u poređenju sa vrednostima izmerenim kod pšenice gajene na B₅ medijumu. Azot kao jedan od najvažnijih makronutrijenata ima najvažniju ulogu u povećanju prinosa gajenih biljaka što potvrđuju i dobijeni podaci (Jaćimović i sar., 2012). Prethodna istraživanja potvrđuju da su rast, razvoj i biomasa direktno zavisni od asimilacije azota (Anas i sar., 2020).

Tabela 2. Efekat medijuma na svežu i suhu masu *T.aestivum*
 Table 2. Effect of medium on the fresh and dry weight of *T. aestivum*

Medijum <i>Medium</i>	Sveža masa (g) <i>Fresh weight</i>	Suva masa (g) <i>Dry weight</i>
Murashige i Skoog	0,324 ± 0.003	0,091 ± 0,004
Gamborg B ₅	0,205 ± 0.07	0,089 ± 0,016

Efekat medijuma na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata *T.aestivum*

Efekat tipa medijuma na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata ispitan je merenjem koncentracije hlorofila *a*, hlorofila *b* i karotenoida (Tabela 3). Izmerena koncentracija hlorofila *a* je u opsegu od 2,437 do 2,477 mg g⁻¹. Dobijene vrednosti za hlorofil *b* su u opsegu od 1,487 do 1,847 mg g⁻¹. Viša vrednost hlorofila *b* izmerena je na MS medijumu koji kao izvor azota sadrži amonijumove i nitratne jone. Izmerene vrednosti koncentracije karotenoida su u opsegu od 0,159 do 0,2 mg g⁻¹, a sinteza ove grupe fotosintetskih pigmenata je intenzivirana u listovima pšenice uzgajane na B₅ medijumu.

Tabela 3. Sadržaj fotosintetičkih pigmenata *T. aestivum* (mg g⁻¹) u zavisnosti od hranljivog medijuma
 Table 3. Contents of photosynthetic pigments of *T. aestivum* (mg g⁻¹) depending on the nutrient medium

Medijum <i>Medium</i>	Hlorofil <i>a</i> <i>Chlorophyll a</i>	Hlorofil <i>b</i> <i>Chlorophyll b</i>	Karotenoidi <i>Carotenoids</i>
Murashige and Skoog	2,437 ± 0,023	1,847 ± 0,015	0,159 ± 0,001
Gamborg B ₅	2,477 ± 0,007	1,487 ± 0,024	0,2 ± 0,001

Hlorofili su biljni pigmenti čija je osnovna uloga konverzija svetlosne u hemijsku energiju. Sadržaj hlorofila direktno određuje fotosintetički potencijal i primarnu produkciju biljaka (Curran i sar., 1990; Filella i sar., 1995). Ranija istraživanja pokazuju da sastav medijuma direktno utiče na koncentraciju fotosintetskih pigmenata (Jakovljević i sar., 2017), kao i da je koncentracija hlorofila *a* i *b* kod pšenice u direktnoj vezi sa količinom dostupnih makronutrijenata (Bojović i Stojanović, 2005).

Zaključak

Različiti tipovi podloga ispoljili su različite efekte na izduživanje korena, izdanaka, biomasu kao i na sadržaj fotosintetičkih pigmenata *T. aestivum* gajenog u kulturi *in vitro*. Može se zaključiti da je za uspostavljanje početne *in vitro* kulture pšenice pogodnija MS u poredjenju sa B₅ podlogom.

Napomena

Istraživanja sprovedena u ovom radu finansiralo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (ev. br. 451-03-68/2022-14/ 200122).

Literatura

- Aćin, V. (2016). Rokovi i gustine setve u funkciji prinosa ozime pšenice u dugotrajnom poljskom ogledu. Doktorska disertacija. Univezitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- Anas, M., Liao, F., Verma, K.K., Sarwar, A.M., Mahmood, A., Chen, L.N., Li, Q., Zeng, X., Liu, Y., Li, Y. (2020). Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efcienc. *Biological Research*, 5-20.
- Biesiada A., Kus A. (2010). The effect of nitrogen fertilization and irrigation on yielding and nutritional status of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum*, 9, 312.
- Bojović, B. M., Stojanović, J. (2005). Chlorophyll and carotenoid content in wheat cultivars as a function of mineral nutrition. *Archives of Biological Sciences*, 57(4), 283-290.
- Curran P.J., Dungan J.L., Gholz H.L. (1990). Exploring the relationship between reflectance red edge and chlorophyll content in slash pine. *Tree Physiology*, 7, 33-48.
- Đurić, N., Cvijanović, G., Dozet, G., Rajičić, V., Branković, G., Poštić, D.(2020). Uticaj godine i lokaliteta na prinos zrna i komponente prinosa kod ozime pšenice. *Selekcija i semenarstvo*, XXVI. doi: 10.5937/SelSem2001009D.
- Filella, I., Serrano, I., Serra, J., Peuelas, J. (1995). Evaluating wheat nitrogen status with canopyreflectance indices and discriminant analysis. *Crop Science*, 35, 1400-1405.
- Gamborg, O. L., Miller, R., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158.
- Golcz A., Polytycka B., Seidler Lozykowska K. (2006). The effect of nitrogen fertilization and stage of plant development on the mass and quality of sweet basil leaves (*Ocimum basilicum* L.). *Herba Polonica*, 52: 2230.
- Jaćimović, G., Malešević, M., Aćin, V., Hristov, N., Marinković, B., Crnobarac, J., Latković, D. (2012). Komponente prinosa i prinos ozime pšenice u zavisnosti od nivoa djubrenja azotom, fosforom i kalijumom. *Letopis naučnih radova*, 72-80.
- Jakovljević, D., Stanković, M., Bojović, B., Topuzović, M. (2017). Regulation of early growth and antioxidant defense mechanism of sweet basil seedlings in response to nutrition. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(11), 243.
- Jakovljević, D. (2020). Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) u kulturi *in vitro*. Zadužbina Andrejević, Beograd.

- Jovović, Z., Mandić, D., Pržulj, N., Velimirović, A., Dolijanović, Ž. (2017). Genetički resursi pšenice (*Triticum* sp.) u Crnoj Gori. XX Savetovanje o biotehnologiji. Zbornik radova.
- Liu, B., Wu, J., Yang, S., Schiefelbein, J., Gan, Y. (2020). Nitrate regulation of lateral root and root hair development in plants. *Journal of Experimental Botany*, 15-71 pp. 4405–4414. doi:10.1093/jxb/erz536.
- Mirosavljević, M., Denčić, S., Momčilović, V., Mikić, S., Trkulja, D., Vučković, M. (2019). *Ns igra – nova sorta ozime pšenice. Selekcija i sementarstvo*, XXV.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Vuksanović, V. (2019). Tolerantnost selekcija bele topole prema abiotičkim činiocima u uslovima *in vitro*. Doktorseka disertacija. Univerzitet u Novom Sadu Poljopreivredni fakultet.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307-313.

PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.) GROWN UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Jovana Momčilović, Dragana Jakovljević, Milica Kanjevac, Biljana Bojović

Abstract

This study aimed to examine the effect of different media - Murashige Skoog (MS) and Gamborg (B₅) on the growth and development of *in vitro* seedling cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). The effects were evaluated through the measurement of root and shoot length, fresh and dry mass, as well as through the determination of the concentration of photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoids). The obtained data indicate that MS has better effects on the growth and development of wheat seedlings, since longer shoot length, and better fresh weight were observed on seedlings from this type of media. Additionally, higher chlorophyll *b* concentration and lower carotenoid concentration were measured in wheat leaves grown on MS medium. It can be concluded that MS is more suitable for establishing the initial *in vitro* culture of wheat compared to the B₅ medium.

Ključne reči: growth, *in vitro*, *Triticum aestivum*, chlorophyll

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Serbia (biljana.bojovic@pmf.kg.ac.rs);