
Gorjana Kisa

Uticaj giberelina i svetlosti na izduživanje stabla izdanaka vilenog sita (*Carlina acaulis* L.) dobijenih u kulturi *in vitro*

Carlina acaulis L. je uspešno uvedena u kulturu *in vitro*. Dobijeni su izdanci koji su iskorišćeni u eksperimentu za ispitivanje uticaja giberelina i svetlosti na izduživanje stabla. Rezultati pokazuju da su se najviše izdužili izdanci gajeni u uslovima mraka sa dodatkom giberelina u hranljivoj podlozi. Izdanci gajeni u uslovima mraka bez dodatnih hormona, manje su se izdužili. Grupa biljaka gajena u uslovima svetla pokazala je izduživanje, ali znatno manje od biljaka gajenih u uslovima mraka. Takođe, nije primećena razlika kod biljaka gajenih u uslovima svetla i onih koje su kultivisane u uslovima svetla uz dodate hormone. To ukazuje da nije u pitanju inhibicija u biosintetskom procesu giberelina pod uticajem povećane iradijacije, već promene na nivou molekula giberelina ili njegovih receptora.

Uvod

Carlina acaulis L. iz familije Asteraceae raste na visokoplaninskim livadama, na sušnim, stenovitim, travnim i žbunastim mestima. Kod nas je rasprostranjena u Zapadnoj Srbiji na Povlenu, Zlatiboru i Medvedniku. To je višegodišnja biljka, bez stabljike. Rizom je deblji, vretenast i vertikalni. Listovi su 30 cm dugački, 6 cm široki, duguljasti, sa gornje strane svetlozeleni, sjajni, malo vunasto dlakavi, jedanput ili dvaput perasto deljeni, sa svake strane sa po 10-12 režnjeva, a svi sa bodjastim zupcima. Rasporedeni su u vidu rozete. Glavica ima 5-13 cm u prečniku i najčešće je pojedinačna. Cvetovi su dugački, beličaste boje. Plod je ahenija, 5 mm dugacka. Cveta od VIII-IX meseca. Na svom prirodnom staništu, *C. acaulis* L. ima isključivo rozetastu formu. Poznato je da se sa nadmorskom visinom povećava intenzitet svetlosti. Nedostupnost fitohormona giberelina u biljkama pod ovakvim svetlosnim uslovima je moguć uzrok ove pojave (Flora Srbije 1976).

Giberelini (GA_3) su fitohormoni koji regulišu mnoge procese tokom ontogenetskog razvoja biljke (izduživanje izdanka, indukcija germinacije kod semena, izazivanje partenokarpije, indukcija sinteze mnogih enzima).

Gorjana Kisa (1983),
Beograd, Marijane
Gregoran 79,
Učenica 3. razreda V
beogradske gimnazije

MENTOR:

Danijela Mišić,
apsolvent, Biloški
fakultet u Beogradu



Slika 1.
Carlina acaulis L.

Figure 1.
Carlina acaulis L

U biljkama postoji više različitih giberelina, od kojih su samo neki aktivni. Njihova sinteza se odvija pre svega u tkivima koja rastu (meristemi izdanaka i korenova, nezrela semena i plodovi i mladi listovi). Po hemijskom sastavu pripadaju diterpenima, sadrže 19-20 C-atoma (Krishnamoorthy *et al.* 1975).

U *in vitro* kulturama, giberelini se koriste kao stimulatori rasta, formiranja i izduživanja izdanaka. Kultura tkiva *in vitro* je skup tehnika koje omogućavaju gajenje biljnih ćelija, tkiva, organa i čitavih biljaka u sterilnim i strogo kontrolisanim uslovima neograničeno dugo. Daje mogućnosti za proučavanje mnogih fizioloskih procesa i danas je sve više u upotrebi (Vinterhalter i Vinterhalter 1996).

Receptor na ćeliji za koji se vezuje giberelin još uvek nije otkriven. Postoje dve hipoteze o njegovoј lokalizaciji. Po prvoj postoje eksterna receptorna mesta (na plazma membrani). Druga, zbog strukturne sličnosti GA sa životinjskim steroidnim hormonima, prepostavlja da on ulazi u ćeliju gde se ponaša poput steroidnog receptornog sistema. Poslednji podaci više podržavaju hipotezu o eksternom mestu percepcije. Način transdukcije GA signala nije još uvek u potpunosti rasvetljen (Krishnamoorthy *et al.* 1975).

Pokušaji da se odgonetne efekat svetlosti na aktivnost giberelina u biljci su do danas bili neuspešni. Postoji hipoteza da svetlost deluje inhibitorno na sintezu giberelina (Brian & Hemming 1955). Dosadašnja saznanja podržavaju zaključke koje su izveli Kende & Lang (1964): veća je verovatnoća da svetlost reguliše osetljivost na giberelin, nego sintezu giberelina. Isti autori su prepostavili da svetlost može delovati na dva načina:

(1) dovodi do promene osobina GA receptora i (2) snižavanjem njihovog afiniteta za gibereline inhibira sintezu receptornih molekula smanjujući na taj način broj mesta za vezivanje GA.

Svetlost može izazvati smanjenu osetljivost tkiva na giberelin povećanjem nivoa inhibitornih supstanci koje blokiraju receptorna mesta za njega, kao i onih supstanci koje sa njim reaguju. Na taj način se stvaraju kompleksni molekuli koji su kao takvi neprepoznatljivi GA receptorima (Krishnamoorthy *et al.* 1975).

Cilj ovog rada je određivanje uzroka koji dovode do formiranja rozetaste forme stabla kod *C. acaulis* L. na njenim prirodnim staništima, kao i provera pretpostavke da li je nedostupnost GA u uslovima visokog intenziteta svetlosti, uzrok ove pojave. U eksperimentu su korišćene biljke *C. acaulis* L. dobijene iskljivanjem semena koja su sakupljena oktobra 1999. godine na Medvedniku. Klijanci su zatim gajeni u uslovima *in vitro*.

Materijal i metode

Semena *C. acaulis* L. uzeta iz prirode, tretirana su na sledeći način: semena su sterilisana, nakon čega su držana u 1 mM rastvoru GA₃ da bi se izazvala indukcija semena. Klijanci su prebačeni na hranljivi medijum i zatim je postavljen eksperiment.

Sterilizacija semena

- potapanje u 20% rastvor sredstva za beljenje (natrijum-hipohlorit) u trajanju od 10 min.
- ispiranje sterilnom dejonizovanom vodom 5 puta
- izolovani su embrioni ukalnjanjem semenjače mehaničkim putem
- ponovna sterilizacija rastvorom sredstva za beljenje i ispiranje sterilnom dejonizovanom vodom 5 puta

Indukcija klijanja semena

Nakon sterilizacije, semena su držana u 1 mM rastvoru GA₃ koji je sadržao nistatin (500 mg/L), da bi se izazvala indukcija klijanja semena. Posle 12 dana, ponovljen je postupak sterilizacije u rastvoru sredstva za beljenje i ispiranje 5 puta sterilnom dejonizovanom vodom.

Medijum za gajenje kulture

Klijanci su prebačeni na MS hranljivi medijum (Murashige&Skoog 1962) koji je sadržao: agar (0.7%), saharozu (3%), inozitol (100 mg/L), FeEDTA (5 mL/L). Nakon mesec dana držanja na ovom medijumu, izdanci *C. acaulis* L. koji su formirali po 4 nodusa (2 lista u svakom), iskorišćeni su za eksperiment. Za eksperiment je spremljen osnovni MS medijum. Jednoj polovini je dodat 1 mM rastvor giberelina (GA₃).

Postavka eksperimenta

Izdanci *C. acaulis* L. su izmereni na milimetarskom papiru. Praćeni su parametri: dužina izdanaka, broj listova, broj nodusa, dužina internodija. Biljke su podeljene na četiri grupe, u zavisnosti od uslova u kojima su gajene:

1. MS medijum, bez dodatih hormona, na svetlu, kontrolna grupa
2. MS medijum, bez dodatih hormona, u mraku, kontrolan grupa
3. MS medijum, sa 1 mM rastvorom giberelina, na svetlu
4. MS medijum, sa 1 mM rastvorom giberelina, u mraku

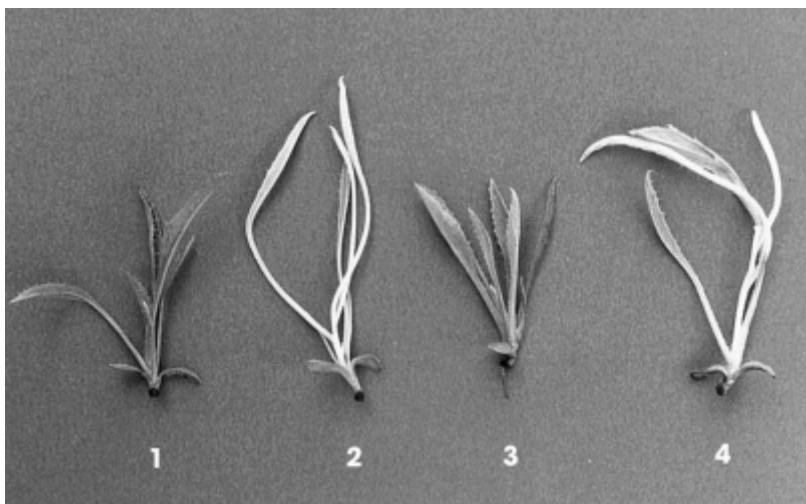
Biljke koje su gajene na svetlu su kultivisane pod uslovima dugog dana (16^h svetla, 8^h mraka) na temperaturi od $22\pm2^{\circ}\text{C}$, u sobi za gajenje kulturna. Biljke gajene u mraku su bile pod istim temperaturnim uslovima.

Rezultati i diskusija

Carlina acaulis L. je uspešno uvedena u kulturu in vitro. Dobijene biljke, podeljene su u 4 eksperimentalne grupe i gajene pod različitim uslovima svetlosti i mraka. Nakon 10 dana, koliko je trajao eksperiment, ponovo su izmereni praćeni parametri: dužina izdanaka, broj listova, broj nodusa, dužina internodija.

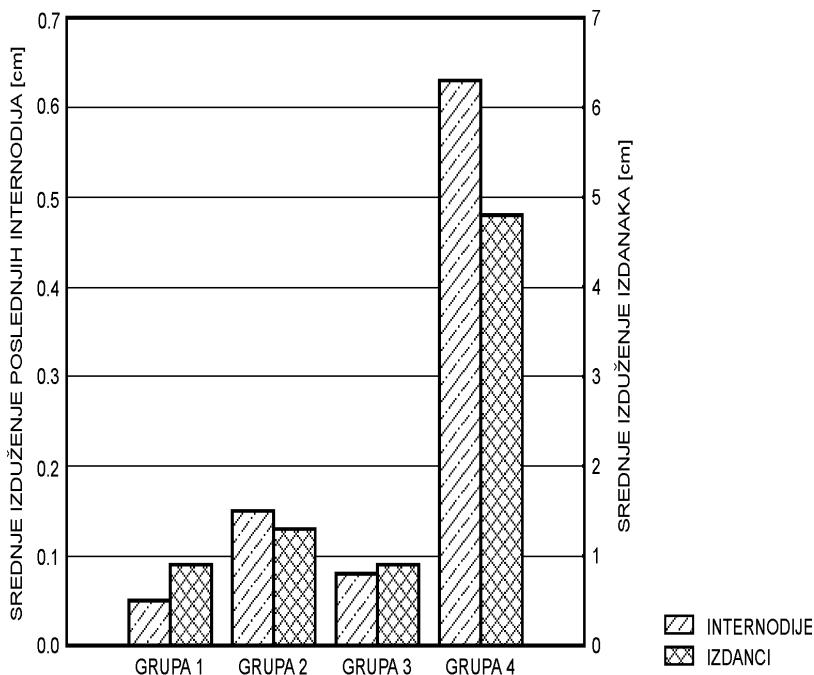
Rezultati pokazuju da su se najviše izdužili izdanci gajeni u uslovima mraka sa dodatkom GA_3 u hranljivu podlogu (grupa 4). Izdanci koji su gajeni u uslovima mraka bez dodatih hormona (grupa 2), manje su se izdužili.

Eksperimentalna grupa biljaka koje su gajene na svetlu (grupa 1), pokazala je izduživanje, ali znatno manje od biljaka gajenih u mraku. Takođe, nije primećena razlika u izduživanju izdanaka kod biljaka gajenih u uslovima svetla, i onih koje su kultivisane pod uslovima svetla, uz dodatne hormone. Biljke gajene u mraku, pokazale su etioliranost (slika 2).



Slika 2.
Uticaj giberelina i
svetlosti na
izduživanje izdanaka
C. acaulis L.

Figure 2.
The influence of
giberelline and light
on stem elongation of
Carlina acaulis L.



Slika 3.
Srednje izduživanje izdanaka i poslednjih internodija za sve četiri grupe biljaka.

Figure 3.
Average elongation of stem and internodes for 4 experimental groups

Podaci o izduživanju poslednjih internodija *C. acaulis* L. pokazuju isti odnos kod sve četiri grupe, kao podaci dobijeni za izduživanje čitavih izdanaka (slika 3).

Zaključci

1. *C. acaulis* L. je uspešno uvedena u kulturu *in vitro*.
2. Biljke gajene u uslovima mraka, su se znatno više izdužile u odnosu na one gajene na svetlu, što pokazuje da svetlost utiče na dostupnost giberelina u biljkama *C. acaulis* L.
3. Kod grupe gajenih na svetlu ustanovljeno je podjednako izduživanje izdanaka bez obzira da li je hormon dodat ili nije. Zaključeno je da nije u pitanju inhibicija sinteze giberelina, jer je on trećoj grupi biljaka egzogeno dodat, pa time i dostupan.
4. Na osnovu najnovijih hipoteza koje objašnjavaju nedostupnost giberelina u uslovima povećane iradijacije (Jamaguchi *et al.* 1998), može se zaključiti da je u pitanju promena na nivou molekula giberelina, tj. 3-hidroksilacija giberelina. Posledica toga je nepoznatljivost molekula GA
5. Kod izdanaka *C. acaulis* L. koje su gajeni u mraku, više su se izdužili oni kojima su dodati fitohormonii. Uzrok toga je verovatno

kratko trajanje eksperimenta od samo 10 dana. Usled toga, za razliku od biljaka kojima je fitohormon bio dostupan u vidu egzogeno dodatog giberelina, kod biljaka kojima fitohormon nije dodat nije došlo do maksimalnog aktiviranja biosinteze giberelina i njegovog transporta do ciljnih ćelija, pa time i većeg izduživanja izdanaka. Ove pretpostavke potvrđuju ranije dobijeni podaci koji govore o tome da su se obe grupe biljaka *C. acaulis* L. koje su gajene u mraku u istim uslovima kao u našem eksperimentu, jednako izdužile, ali u vremenskom periodu od 2 meseca (Grubišić, usmena informacija).

6. Obe grupe gajene u uslovima mraka su pokazale etioliranost.
 7. Utvrđeno je da različiti uslovi pod kojima su izdanci gajeni nemaju efekta na izduživanje listova *C. acaulis* L.
-

Literatura

- Flora Srbije 1976. *Flora SR Srbije*, tom VII. Beograd: SANU
- Vinterhalter D., Vinterhalter B. 1996. Kultura *in vitro* i mikropropagacija biljaka. Beograd:
- Denffer D., Ziegler H. 1988. *Morfologija i fiziologija*. Zagreb: Školska knjiga
- Krishnamoorthy H N. 1975. *Gibberellins and Plant Growth*. Wiley
- Ritchie, S., Gilroy, S. 1998. *Gibberellins: regulating genes and germination*. The Pennsylvania State University
- Yamaguchi S., Sminth M.W., Brown R.G.S., Kamiya Y., Sun T-P. 1998. Phytochrome regulation & differential expression of gibberelline 3--hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant cell*, **10**

Gorjana Kisa

The Influence of Gibberelline and Light on Stem Elongation of *Carlina acaulis* L. Devived *in vitro*

Carlina acaulis L. (fam. Asteraceae) grows on high mountain fields on dry, rocky, grassy, bushy places. It is a perennial stemless plant. In its natural surrounding *C. acaulis* L. only has rosette form. It's well known fact that with the rise of the amplitude, the light intensity grows. That could be the main reason for unavailability of phytohormon gibberelline. Gibberellins (GA) are the phytohormons which regulate many processes during the ontogenetic development of plants. In *in vitro* cultures, gibberel-

lins are used as growth stimulus, for create and elongation of shoots. The aim of this project is determination of causes which leads to forming rossete in *C. acaulis* L. on its natural residence and confirmation of our basic hypothesis that unavailability of GA in high light intensity is the reason for this way of development. *C. acaulis* L. seeds collected from Medvednik mont. were sterilized, and than kept in 1 mM solution of GA₃ to induce germination. Seedlings were transferred to medium, and than the experiment was established. *In vitro* culture of *C. acaulis* L. was successfully established. The shoots derived from seeds, were used to determine gibberelline and light influence on stem elongation. These plants were divided into four experimental groups and grown in different light conditions. After 10 days, which was duration of experiment, parameters were measured again (stem length, number of leaves, nodes and internodes length). The results show that the dark grown plants were more elongated than light grown plants. It points to the fact that light has influence on availability of gibberelline in *C. acaulis* L. plants. Shoots in exp. group 1. and 3. were equally elongated. We concluded that it was not matter of synthesis inhibition of gibberelline. Based on the newest hypotheses which explains unavailability of gibberelline in condition of greater irradiation, we can conclude that it's a change in gibberelline molecule. That is 3-hydroxylase of gibberelline. It leads to impossibility for receptor to recognize GA molecule. Dark grown plants were etiolated.

