

UDK: 582.681.81:630\*2

Izvorni naučni rad *Original scientific paper*

## PROMENE pH VREDNOSTI PODLOGE PRILIKOM MIKROPROPAGACIJE BELE TOPOLE

Vanja Vuksanović<sup>1</sup>, Branislav Kovačević<sup>2</sup>, Saša Orlović<sup>2</sup>, Dragana Miladinović<sup>3</sup>,  
Marko Kebert<sup>2</sup>, Marina Katanić<sup>2</sup>

**Izvod:** U ovom istraživanju je ispitivana promena pH vrednosti hranljive podloge nakon 35 dana kultivacije četiri genotipa bele topole (*Populus alba* L.). Ispitane su četiri početne pH vrednosti podloga: 3,0, 4,0, 5,5 i 7,0 puferisane natrijum citratnim puferom, kao i standardna podloga za umnožavanje sa pH 5,5 bez dodavanja limunske kiseline (kontrola). Sterilizacija podloge je izvršena u mikrotalasnoj pećnici. Rezultati analize varijanse ukazuju da su konačni pH podloge nakon kultivacije, kao i razlika između krajnje i početne pH podloge veoma značajno zavisili od početne pH. Takođe je i interakcija genotip × podloga pokazala statistički značajan uticaj na pomenuta svojstva. Na podlogama sa niskom početnom pH je zabeležena pozitivna, dok je na podlozi pH 7,0 zabeležena negativna promena pH tokom kultivacije. Rezultati istraživanja ukazuju da promene pH podloge tokom kultivacije vode ka vrednosti pH 5,5 za koju pretpostavljamo da bi bila optimalna za njihov uzgoj u uslovima *in vitro* (oko pH 5,5). Diskutovana je mogućnost primene dobijenih rezultata u unapređenju uzgoja bele topole *in vitro* i ocene genotipova u projektima melioracije i fitoremedijacije.

**Ključne reči:** pH podloge, *Populus alba*, mikropropagacija

### *CHANGES IN MEDIUM pH DURING WHITE POPLAR MICROPROPAGATION*

**Abstract:** *In this study, changes in the pH of the nutrient medium were investigated after 35 days of cultivation of four white poplar genotypes (Populus alba L.). Four initial pH values of the substrate were tested: 3.0, 4.0, 5.5 and 7.0 buffered sodium citrate buffer, as well as a*

---

<sup>1</sup> Vanja Vuksanović, student doktorskih studija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Republika Srbija; Dr Branislav Kovačević, viši naučni saradnik, prof. dr Saša Orlović, naučni savetnik, dr Marko Kebert, naučni saradnik, dr Marina Katanić, naučni saradnik, Univerzitet u Novom Sadu, Institut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, Antona Čehova 13, 21000 Novi Sad, Republika Srbija; <sup>3</sup> dr Dragana Miladinović, naučni savetnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtastvo, Maksima Gorkog 42, Republika Srbija

<sup>1</sup> Vanja Vuksanović, MSc, University of Novi Sad, Faculty of agriculture, Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia; <sup>2</sup> Dr Branislav Kovačević, senior research associate, prof. dr Saša Orlović, principal research fellow, dr Marko Kebert, research associate, dr Marina Katanić, research associate, University of Novi Sad, Institute of lowland forestry and environment, Antona Čehova 13, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia; <sup>3</sup> Dragana Miladinović, principal research fellow, Research institute of field and vegetable crops, Maksima Gorkog 42, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia

*standard medium for micropropagation with pH 5.5 without the addition of citric acid (control) The medium was sterilized in a microwave oven. The results of the variance analysis indicate that the final pH of the medium after cultivation, as well as the difference between the final and the initial pH of the medium, was significantly influence of initial pH, as well as the interaction of the genotype × medium, differences between genotypes in their reaction to the washed pH medium. On media with low initial pH was recorded positive, while the medium pH 7.0 was recorded negative change pH after cultivation. The results of the study indicate that changes in the pH of the medium during cultivation lead to a pH that is assumed to be optimal for their cultivation under in vitro conditions (cca. pH 5.5). The possibility of applying the obtained results in the improvement of the white poplar cultivation in vitro and the assessment of genotypes in melioration and phytooremediation projects is discussed.*

**Keywords:** Medium pH, *Populus alba*, micropropagation

## UVOD

Bela topola (*Populus alba* L.) je drvenasta vrsta koja se, uprkos svojoj visokoj prilagodivosti, smatra ugroženom vrstom i pokazateljem biodiverziteta (Kovačević et al., 2010a). Pored korišćenja u proizvodnji drveta (Redei et al., 2013), ova vrsta ima široku implementaciju u hortikulturi i pejzažnoj arhitekturi, posebno genotipovi sa piramidalnom krošnjom (Eggens et al., 1972; Kovačević et al., 2010b). U biotehnološkim istraživanjima, bela topola ima značajno mesto i smatra se model drvenastom vrstom (Confalonieri et al., 2000).

Vrednost pH supstrata je od velikog značaja za biljni svet, pošto neposredno i/ili posredno utiče na promet materije i energije biljaka, a time na njihovo rastanje i razviće i konačno na organsku produkciju tj. prinos (Kastori et al., 1996). Reakcija sredine utiče na sve fiziološke i biohemijske procese koji se odigravaju u ćelijama (Kurkdjian et al., 1982). Velika rasprostranjenost kiselih zemljišta u svetu (Von Uexkull i Mutert, 1995) čini poznavanje tolerancije biljaka prema reakciji zemljišta izuzetno značajnim.

pH vrednost medijuma utiče na: rastvorljivost soli, pristupačnost aktivnih materija, adsorpciju hranljivih materija, hemijske reakcije i geliranje agara, što dovodi do činjenice da je opseg optimalnih pH vrednosti za podlogu ograničen. Međutim, većina hranljivih podloga za kulturu tkiva je slabo puferisana (Martin, 1980; Skirvin et al., 1986) i kao takva podložna je stalnim promenama u pH. Na promene pH utiče sastav hranljive podloge, metoda sterilizacije i vrsta biljnog materijala koji se uzgaja. Temperatura sterilizacije može značajno uticati na promenu početne pH vrednosti hranljive podloge utiče na denaturaciju proteina, hidrolizu ugljenih hidrata (Schenk et al., 1991) i rastvorljivost soli (Behagel 1971).

Vrednost pH se menja i u kulturi tokom gajenja, te pojedini autori predlažu povećanje puferne sposobnosti hranljivih podloga (Skirvin, 1986, Vuksanović et al., 2016). Puferi (puferske smeše ili regulatori pH) predstavljaju takve sisteme koji su sposobni da se odupiru promeni pH u rastvorima. Puferi imaju važnu ulogu u održavanju određenog nivoa kiselosti u biološkim sistemima. Delovanje puferskih smeša može se predstaviti kao poseban slučaj delovanja zajedničkog jona u rastvorima slabih elektrolita.

Kultura *in vitro* omogućava da se u kontrolisanim uslovima vrši ispitivanje efekta raznih aktivnih materija, i drugih abiotičkih faktora na rast i razvoj biljaka (Bonga, 1982). Mnogi istraživači su ispitivali uticaj pH vrednosti podloge na rast i razvoj biljaka u kulturi *in vitro* (De Klerk et al., 2008; Ostrolucká et al., 2010; Anderson i Ievinsh, 2008; Kovačević et al., 2013; Bhatia i Ashwath, 2005; Liefert et al., 1995; Martins et al., 2011; Ruzić, 2004), ali samo mali broj istraživača se do danas bavio ispitivanjem promena pH vrednosti podloge tokom kultivacije.

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita vrednost pH hranljive podloge pre i nakon gajenja četiri genotipa bele topole u uslovima *in vitro* prema reakciji podloge. Primena hranljivih podloga sa niskim vrednostima pH u kulturi belih topola bi mogla da bude od značaja sa aspekta ispitivanja tolerantnosti genotipova prema kiselosti substrata i kao i drugih abiotičkih faktora u kombinaciji sa kiselom podlogom. Ovakva istraživanja bi bila osnov za postavku testova *in vitro*, koji bi prethodili poljskim testovima tolerantnosti i adaptabilnosti genotipova bele topole na kiselim zemljištima.

## MATERIJAL I METODE

### Biljni materijal

Za ogled je odabrano četiri genotipa bele topole (*Populus alba L.*) koje karakteriše dobar rast u kulturi tkiva i genetička divergentnost (Guzina i Tomović 1989; Confalonieri et al., 2000; Kovačević et al., 2010a) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Ispitivani genotipovi bele topole

*Table 1. Examined white poplar genotypes*

<b>Ime Name</b>	<b>Poreklo <sup>a)</sup> Origin <sup>a)</sup></b>	<b>Opis Description</b>
"Villafranca" "Villafranca"	Italija Italy	Model genotip, pravo stablo uzane krošnje Model genotype, straight, narrow tree shape
L-12 L-12	Srbija Serbia	Eksperimentalni klon, vigorozno pravo stablo Experimental clone, vigorous straight tree shape
L-80 L-80	Srbija Serbia	Eksperimentalni klon, vigorozno pravo stablo Experimental clone, vigorous straight tree shape
LBM LBM	Srbija Serbia	Genotip hortikulturnog značaja, pravo piramidalno stablo Horticultural genotype, straight pyramidal tree shape

<sup>a)</sup> Svi ispitivani genotipovi su selektovani u Institutu za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, Novi Sad, Srbija, osim klona "Villafranca" koji je selektovan u Poplar Research Institute in Casale Monferrato, Italija

<sup>a)</sup> All examined genotypes were selected in Institute of Lowland Forestry and Environment, Novi Sad, Serbia, except the clone "Villafranca", that was selected in Poplar Research Institute in Casale Monferrato, Italy.

### **Priprema podloge**

U istraživanju je korišćenja podloga za umnožavanje bele topole zasnovana na Aspen Culture Medium (Ahuja, 1984) sa dodatkom 9 gL<sup>-1</sup> agara i 20 gL<sup>-1</sup> saharoze, 1μM kinetina, 1μM BAP i 100 mg mioinozitola. Ispitivane su četiri početne pH vrednosti podloge: 3,0, 4,0 5,5 i 7,0, gde je natrijum citratni pufer korišćen za podešavanje pH, kao i standardna podloga za umnožavanje bez natrijum citratnog pufera sa pH 5,5 (kontrola). Sterilizacija podloge vršena je u mikrotalasnoj pećnici. Podloga je bila tretirana do početka ključanja, a zatim razlivena u staklene sterilne posude. Razlivanje podloge obavljeno je u laminarnoj komori. Na ovaj način potencijal zgrušavanja agara je ispoljen i u podlogama sa pH 3 i pH 4 (Kovačević et al., 2013). U svim puferisanim podlogama limunska kiselina u monohidratnoj formi dodata je u količini od 1,2 g/L i podešavane su vrednosti pH korišćenjem 1M NaOH. Natrijum citratni puferi sistem je korišćen kako bi se očuvala stabilnost pH vrednosti podloge u skladu sa preporukom Skirvin et al., (1986).

### **Uticaj pH vrednosti podloge na rast i razvoj biljaka**

Da bi se ispitale promene pH vrednosti podloge, vrhovi izbojaka četiri navedena genotipa bele topole visine od 1 do 1,5 cm su postavljeni na ispitivane podloge. Biljni materijal je gajen u teglicama zapremine 190 ml sa 25ml čvrste podloge. Kulture su uzgajane na temperaturi 26 ± 2 °C i bile izlagane beloju svetlosti fluorescentnih cevi od 3500 lx u trajanju od 16 časova dnevno. Za ispitivanje promena pH vrednosti podloge nakon 35 dana kultivacije izmeren je pH podloge za svaku teglicu odvojeno. Podloga je najpre ručno homogenizovana plastičnom viljuškom, zatim je dodato 25 ml dejonizovane vode. Nakon dodatnog mešanja na magnetnoj mešalici meren je konačni pH podloge uranjanjem pH elektrode u dobijenu emulziju.

### **Statistička analiza**

Ogled je koncipiran po principu potpuno slučajnog rasporeda. U okviru svakog genotipa bilo je pet ponavljanja za svaku testiranu počenu pH vrednost podloge, pri čemu je jedno ponavljanje činila jedna teglica sa pet postavljenih eksplantata. Dobijeni rezultati su obrađeni metodom dvofaktorijalne analize varijanse, a razlike između pojedinih medijuma, genotipova i njihove interakcije su utvrđene i prikazane NZR – testom (test najmanje značajne razlike). Za obradu podataka korišćen je programski paket STATISTICA 10 (StatSoft Inc., 2012).

## **REZULTATI I DISKUSIJA**

Značajan problem prilikom pravljenja podloga sa niskom pH vrednošću predstavlja konzistencija podloge, koja može biti narušena autoklaviranjem (De Klerk et al., 2008). Ovaj problem je rešen sterilizacijom podloge u mikrotalasnoj

pečnici (Kovačević et al., 2013). Eventualno povećanje koncentracije agara radi obezbeđivanja čvrstine podloge bi moglo da dovede do smanjenja mogućnosti usvajanja raspoloživih hranljivih materija i organskih supstanci za tkivo (Van Winkle et al., 2003).

Puferna sposobnost standardne podloge je relativno slaba, pa se pH vrednost podloge menja kako tokom autoklaviranja, tako i nakon postavke eksplantata u kulturi *in vitro* (Skirvin et al., 1986; De Klerk et al., 2008; Kovačević et al., 2013). Takođe, utvrđeno je da stabilnost pH podloge zavisi i od hemijskog sastava podloge, načina skladištenja i načina sterilizacije (Anderson i Ievinsh, 2008; Owen et al., 1991; Sarma et al., 1990). U tom smislu, Skirvin et al., (1986) preporučuju korišćenje citratnog pufera, te je u našem istraživanju, u cilju stabilizacije željenog pH korišćen natrijum citratni pufer.

Ipak, do promena pH podloge tokom kultivacije je došlo. Rezultati analize varijanse nakon 35 dana *in vitro* kultivacije su pokazali da su konačni pH podloge nakon kultivacije, kao i razlika između krajnje i početne vrednosti pH podloge veoma značajno zavisili od početne pH, a značajno od interakcije genotip  $\times$  podloga tj. od razlika među genotipovima u njihovoj reakciji na ispitivane počene pH podloge (Tabela 2). Rezultati pokazuju i da uticaj razlika između ispitivanih genotipova u totalu nije bio statistički značajan.

**Tabela 2.** Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse za ispitivane pH vrednosti podloge <sup>a)</sup>

**Table 2.** The results of two - way analysis of variance for test medium of pH <sup>a)</sup>

<b>Izvor variranja</b> <i>Source of variation</i>	<b>Konačna pH</b> <i>pH final</i>		<b>Promena pH</b> <i>Change pH</i>	
	<b>Sredina kvadrata</b> <i>Mean square</i>	<b>F-test</b> <i>F-test</i>	<b>Sredina kvadrata</b> <i>Mean square</i>	<b>F-test</b> <i>F-test</i>
<b>Genotip (A)</b> <i>Genotype (A)</i>	0,01	0,61	0,01	0,69
<b>Podloga (B)</b> <i>Medium (B)</i>	10,92	454,37 **	16,48	773,68 **
<b>Interakcija A <math>\times</math> B</b> <i>Interaction A <math>\times</math> B</i>	0,13	5,36 **	0,11	5,33 **
<b>Pogreška</b> <i>Error</i>	0,02		0,02	

<sup>a)</sup> Stepeni slobode za genotip:  $DF_A = 3$ , stepeni slobode za podlogu  $DF_B = 4$ , stepeni slobode za interakciju  $A \times B$ :  $DF_{A \times B} = 12$ , stepeni slobode za pogrešku  $DF_{ERR} = 80$

<sup>a)</sup> Degrees of freedom for genotype:  $DF_A = 3$ , degrees of freedom for medium  $DF_B = 4$ , degrees of freedom for interaction genotype  $\times$  medium:  $DF_{A \times B} = 12$ , degrees of freedom for error  $DF_{ERR} = 80$

Prema rezultatima testa najmanjih značajnih razlika (NZR – test) postoji značajna razlika među ispitivanim podlogama u krajnjoj pH podloge, kao i u razlici između početne i krajnje pH nakon 35 dana kultivacije. Podloge sa pH 5,5 (pH 5,5 sa natrijum citratnim puferom i kontrola) su ostvarile male promene pH podloge i krajnja pH podloge je iznosila takođe oko 5,5. Međutim, podloge sa niskim početnim pH su, uprkos korišćenju natrijum citratnog pufera, ostvarile značajnu pozitivnu promenu pH tokom kultivacije, pri čemu je podloga sa početnom pH 4,0

dostigla krajnju pH vrednost vrlo blizu pH 5,5, uz promenu pH od +1,49. Kod podloge sa početnom pH 3,0 je ostvarena takođe značajna promena pH ( $\Delta\text{pH}=+1,28$ ), ali je ostvarena krajnja pH vrednost od svega 4,29. Sa druge strane, na podlozi sa početnom pH 7,0 je postignuta značajna promena pH, ali negativne vrednosti ( $\Delta\text{pH}=-0,67$ ), dok je ostvarena krajnja vrednost pH od 6,34 (Grafikon 1, 2).

**Tabela 2.** Rezultati NZR – testa za konačnu pH vrednost i promenu pH vrednosti prema ispitivanim genotipovima bele topole i podlogama <sup>a)</sup>

*Table 2. The results of LSD – test for final pH and change of pH by examined white poplar genotypes and media <sup>a)</sup>*

<b>Genotip</b> <i>Genotype</i>	<b>Podloga</b> <i>Medium</i>	<b>Konačna pH</b> <i>pH final</i>	<b>Promena pH</b> <i>Change pH</i>
"Villafranca"		5,53 <sup>dc</sup>	-0,07 <sup>gh</sup>
L - 12	Kontrola	5,66 <sup>bcd</sup>	-0,02 <sup>g</sup>
L - 80	Control	5,36 <sup>ef</sup>	-0,24 <sup>h</sup>
LBM		5,82 <sup>b</sup>	0,18 <sup>ef</sup>
"Villafranca"		4,16 <sup>i</sup>	1,16 <sup>d</sup>
L - 12	pH 3	4,37 <sup>gh</sup>	1,37 <sup>bc</sup>
L - 80		4,46 <sup>g</sup>	1,43 <sup>ab</sup>
LBM		4,19 <sup>hi</sup>	1,15 <sup>d</sup>
"Villafranca"		5,56 <sup>cd</sup>	1,56 <sup>a</sup>
L - 12	pH 4	5,56 <sup>cd</sup>	1,56 <sup>a</sup>
L - 80		5,57 <sup>cd</sup>	1,6 <sup>a</sup>
LBM		5,18 <sup>f</sup>	1,23 <sup>cd</sup>
"Villafranca"		5,72 <sup>bcd</sup>	0,22 <sup>ef</sup>
L - 12	pH 5,5	5,64 <sup>bcd</sup>	0,22 <sup>ef</sup>
L - 80		5,56 <sup>cd</sup>	0,06 <sup>fg</sup>
LBM		5,75 <sup>bc</sup>	0,29 <sup>e</sup>
"Villafranca"		6,28 <sup>a</sup>	-0,72 <sup>i</sup>
L - 12	pH 7	6,3 <sup>a</sup>	-0,7 <sup>i</sup>
L - 80		6,34 <sup>a</sup>	-0,66 <sup>i</sup>
LBM		6,42 <sup>a</sup>	-0,58 <sup>h</sup>

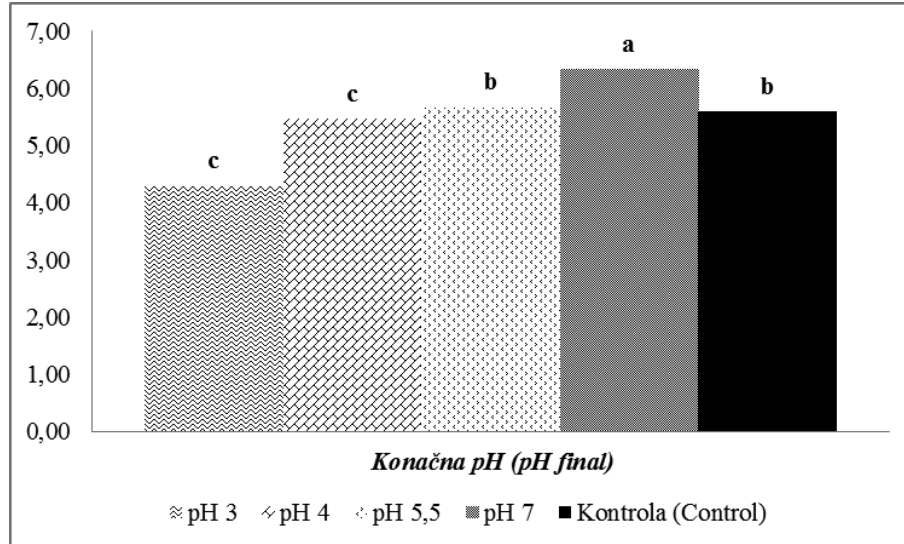
<sup>a)</sup> Razlika između vrednosti obeleženih istim slovom nije statistički značajna za nivo značajnosti  $\alpha=0,05$

<sup>a)</sup> The differences among values of particular characteristic marked with the same letter are not significant at the level  $\alpha=0.05$

Ovaj efekat je jasan kako na nivou tretmana tako, i kod ispitivanih genotipova pojedinačno (Tabela 3). Rezultati NZR testa pokazuju da kod većine ispitivanih genotipova nije bilo statistički značajne razilke u promeni vrednosti pH između kontrolne podloge (bez limunske kiseline i pH 5,5) i podloge pH 5,5 (sa dodatkom limunske kiseline i pH 5,5). Navedeni podaci ukazuju da promene pH vode ka vrednosti pH 5,5. U prilog ovome govori i činjenica da je pH vrednost podloge ACM (Ahuja, 1984), koja je posebno i razvijena za bele topole, pH 5,5-5,6, a slične krajnje vrednosti pH kod genotipova bele topole su dobili i Kovačević et al., (2013).

**Grafikon 1.** Prosečna konačna pH vrednost hranljive podloge posle 35 dana kultivacije kod ispitivanih genotipova bele topole. Slova iznad stubića označavaju pripadnost homogenim grupama ispitivanih genotipova bele topole, na osnovu NZR testa, na nivou  $\alpha=0.05$

**Graph 1.** Average final pH of the media after 35 days of cultivation of examined white poplar genotypes. Letters over the bars represent belonging to homologous groups according to LSD-test at the level  $\alpha=0.05$



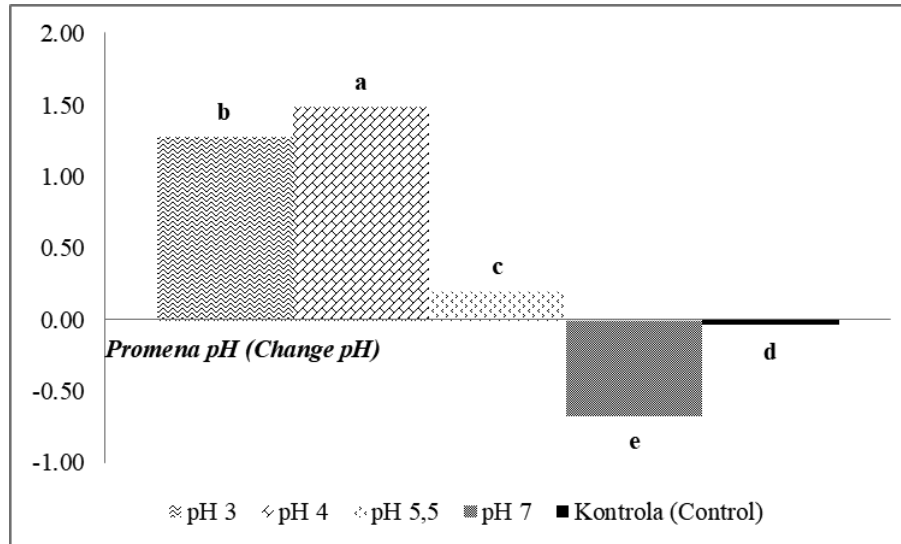
Limunska kiselina i neke druge organske kiseline uticale su na poboljšanje rasta kalusa (Murachige i Tucker, 1969; Erner i Reuveni, 1981). Za razmnožavanje raznih kaktusa iz pazušnih pupoljaka, Vyskot i Jara, (1984) dodavali su natrijum citrat u MS podlogu. Na osnovu dobijenih rezultata njihovih istraživanja u kulturi tkiva domaće crne topole, Vuksanović, (2013) i Vuksanović et al., (2017) zaključuju da efekat snižavanja vrednosti pH uz pojačavanje puferne moći takve podloge dodavanjem limunske kiseline može da bude stimulativan za rast i razvoj biljaka u kulturi *in vitro*.

Unutar biljnog tkiva postoji biohemijski mehanizam regulacije pH, koji se zasniva se na ravnoteži između sinteze i razgradnje jabučne kiseline, i biofizički koji se sastoji od aktivacije fluksa  $H^+$  jona kroz plazmalemu. U slučaju smanjenja pH vrednosti povećava se aktivnost enzima protonske ATP-aze koja izlučuje protone izvan citoplazme, čime se u njoj uspostavlja neutralna pH vrednost (Kurkidijan i Guern, 1989). Kisela spoljašnja sredina povećava permeabilnost plazmaleme za  $H^+$  jone (Yan et al., 1998) i može da smanji vrednost pH unutar ćelije (Plieth et al., 1999; Moseyko i Feldman, 2001). Ipak, variranja pH u podlozi u kulturi tkiva se najčešće tumače razlikama u odnosu amonijačnih i nitratnih jona u podlozi i razlikama u njihovom usvajanju (Dougal, 1980; Woodward et al., 2006). Usvajanjem jona nitrata pH vrednost teži alkalnoj dok se usvajanje  $NH_4^+$  jona rezultira pomeranjem pH ka kiseloj (Street, 1969; Behrend i Mateles, 1975;

Hyndman et al., 1982). Podloge koje sadrže  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$  sa početnim pH od 5 - 6, prioritetno uzimanje  $\text{NH}_4^+$  jona uzrokuje pad pH tokom ranog rasta kulture. Ovo rezultira povećanom upotrebom  $\text{NO}_3^-$  (Martin i Rose, 1976) i postepenim rastom pH. Konačni pH zavisi od odnosa  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$  (Gamborg et al., 1968).

**Grafikon 2.** Promena pH vrednost hranljive podloge posle 35 dana kultivacije za različite početne pH vrednosti hranljive podloge. Slova iznad stubića označavaju pripadnost homogenim grupama ispitivanih genotipova bele topole, na osnovu NZR testa, na nivou  $\alpha=0,05$

**Graph 2.** Change pH of media after 35 days of cultivation for different initial medium pH. Letters over the bars represent belonging to homologous groups according to LSD-test at the level  $\alpha=0.05$



Promene pH podloge variraju među biljnim vrstama, ali je kao i u našem istraživanju primetna promena pH podloge prema jednoj određenoj vrednosti koja je karakteristična za vrstu odnosno genotip. Butenko et al., (1984) navode da je suspenzija ćelija kulture *Dioscorea deltoides* u medijumu po Kaul i Staba (1968), podešena početna pH vrednost iznosila je 3,5, 4,3, 5,8 i 6,3, nakon 10h inokulacije pH vrednost je iznosila od 4,6 do 4,7. U narednih dva dana vrednost pH je nastavila tendenciju opadanja i iznosila od 4,0 do 4,2, ali tokom narednih petnaest dana vrednost pH se postepeno povećala i iznosila je od 4,7 do 5,0, devetnaestog dana pH vrednost je povećana na 6,0 do 6,3. Pelet et al., (1960) u svom istraživanju dolaze do saznanja da prilikom gajenja kalusa *Populus deltoides* i *Ulmus americana* na početnim pH vrednostima u rasponu od 3,0 do 8,0 dolazi do promene početne pH vrednosti podloge. Nakon četiri nedelje kultivacije podloge na kojima su gajene *Populus deltoides* i *Ulmus americana* su imale približnu vrednost pH oko 6,0. Skirvin et al., (1986) su utvrdili da je vrednost pH standardne MS podloge koja je na početku iznosila 3,33, 5,11, 6,63, i 7,98 nakon 48 sati gajenja kalusa *Cucumis kretala* u opsegu od 4,6 do 5,0. Kovačević et al., (2013) su ispitivanjem efekata



niske pH vrednosti hranjive podloge za ožiljavanje, bez hormona i citratnog pufera (pH 3, pH 4 i pH 5,5) dobili vrlo slične krajnje pH vrednosti na svim ispitivanim podlogama na kraju kultivacije od 35 dana unutar ispitivanih genotipova. Oni su takođe našli značajne razlike u krajnjoj pH između ispitivanih genotipova bele topole, ali su te vrednosti varirale u relativno uskom dijapazonu od pH 5,2 do pH 6,0. Oni smatraju da su ispitivane biljke bele topole pokazale sposobnost prilagođavanja pH podloge sopstvenim potrebama. Rezultati u našem radu podržavaju njihov stav, s obzirom da je u našem istraživanju uočena promena pH podloge prema vrednosti od oko pH 5,5 kako na podlogama (pH 3,0 i pH 4,0) niske tako i na podlozi relativno visoke pH (pH 7,0) iako je korišćen snažan natrijum citratni puferni sistem.

Prezentovani rezultati u ovom radu, zajedno sa rezultatima drugih navedenih istraživanja, ukazuju na mogućnost praćenja i upoređivanja sposobnosti genotipova bele topole da menjaju pH podloge u prisustvu pufera. Sa druge strane, poznato je da su biljke sposobne da putem korenskih izlučevina utiču na pH okolnog zemljišta. Bilo direktno ili preko uticaja na razvoj mikroorganizama, biljke na ovaj način utiču na pristupačnost određenih mineralnih materija, koja može da bude ugrožena nepovoljnim pH (Dakora i Phillips, 2002; Marx et al., 2002; Rukshana et al., 2014). Dakle, zajedno sa rezultatima koji pokazuju značaj korišćenja kulture *in vitro* u oceni tolerantnosti genotipova belih topola prema niskom pH podloge (Vuksanović et al., 2016), rezultati u našem radu ukazuju i na mogućnost korišćenja prezentovane *in vitro* metodologije i u oceni sposobnosti genotipova bele topole za promenu pH zemljišta, a time i mogućnost njihovog korišćenja u projektima melioracije i fitoremedijacije. Ipak, za konačnu primenu ocene genotipova da vrše promenu pH u substratu u kulturi *in vitro* su neophodna dalja istraživanja, koja bi dala informacije o jačini i prirodi veze između odnosa među genotipovima dobijenih na osnovu testa u kulturi tkiva i odnosa među genotipovima bele topole koji bi se ostvarili u poljskim uslovima.

## Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan u okviru projekata: „Istraživanje klimatskih promena i njihovog uticaja na životnu sredinu: praćenje uticaja, adaptacija i ublažavanje“ (III43007) koji finansira Ministarstvo za prosvetu i nauku Republike Srbije u okviru programa Integrisanih i interdisciplinarnih istraživanja za period 2011-2017. godine, projekta „Zaštita šuma u JP „Vojvodinašume““, koji finansira JP „Vojvodinašume“, Petrovaradin za 2017. godinu i na osnovu stipendije Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije za studenta doktorskih studija Vanju Vuksanović po Ugovoru br. 1667.

## LITERATURA

Ahuja, M.R. (1984): A commercially feasible micropropagation method for aspen. *Silvae Genet.* 32: 174-176.

- Anderson, W. C. (1975): Propagation of rhododendrons by tissue culture. I. Development of a culture medium for multiplication of shoots. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 25, 129-135.
- Andersone U., Ievinsh G. (2008): Medium pH affects regeneration capacity and oxidative enzyme activity of *Pinus sylvestris* in tissue culture. Acta Univ. Latv. Biol. 745, (25-35)
- Behagel, H. A. (1971) In: Van, Bragt J., Mossel, D. A. A., Pierik, R. L. M., Veldstra, H. (eds) Effects of sterilization on components in nutrient media. Miscellaneous papers 9 Landbouwhogeschool Wageningen The Netherlands.: 117-120.
- Behrend, J., Mateles, R. I. (1975): Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. I. Effect of amino acids on growth. Plant Physiol. 56: 584-589.
- Bonga, J. M. (1982): Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: Bonga, J. M., Durzan D. J. (eds) Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff, The Hague.: 387-412.
- Butenko, R. G., Lipsky, A. K. H., Chernyak, N. D., Arya, H.C. (1984): Changes in culture medium pH by cell suspension cultures of *Dioscorea deltoidea*. Plant Sci. Lett. 35: 207-212.
- Bhatia, P., Ashwath, N. (2005): Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of tomato, Biotechnol. 4: 7-10.
- Confalonieri, M., Belenghi, B., Balestrazzi, A., Negri, S., Facciotto, G., Schenone, G., Delledonne, M. (2000): Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. "Villafranca" and evaluation of herbicide resistance. Plant Cell Rep. 19: 978-982.
- Dakora, F.D., Phillips, D.A. (2002): Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant and Soil 245: 35-47.
- De Klerk, G., Hanecakova, J., Jasik J. (2008): Effect of medium-pH and MES on adventitious root formation from stem disks of apple. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 95: 285-292.
- Dougall, D. K. (1980): Nutrition and metabolism. In: Staba EJ (ed) Plant tissue culture as a source of biochemicals, Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, Florida: 21-58.
- Eggen, C. F., Loughheed, E. C., Hilton, R. J. (1972): Rooting of hardwood cuttings of boleana poplar, Can. J. Plant Sci. 52: 599-604.
- Erner, Y., Reuveni, O. (1981): Promotion of citrus tissue culture by citric acid. Plant Physiol. 67, Suppl., 27.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- Guzina, V., Tomović, Z. (1989): Mogućnost primene metoda kulture tkiva u oplemenjivanju topola. Topola, 155/156: 47-56.
- Hyndman, S. E., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (1982): The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1: 229-238.
- Kastori, R., Milošević, N., (2011): Ekološki i fiziološki aspekti kisele sredine - zemljište, biljke i mikroorganizmi. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

- i Vojvođanska akademija nauka i umetnosti, Novi Sad: 199 str. ISBN 978-86-80417-31-8
- Kaul, B., Staba, E. J. (1968): Dioscorea tissue cultures. 1. Biosynthesis and isolation of diosgenin from *Dioscorea deltoidea* callus and suspension cells. *Lloydia*. 31: 171-179.
- Kovačević B., Miladinović D., Katanić M., Tomović Z., Pekeč S. (2013): The effect of low initial medium pH on in vitro white poplar growth, *Bulletin of the Faculty of Forestry*, 108: 67-80.
- Kovacevic, B., Orlovic, S., Roncevic, S., Miladinovic, D. (2010a): The effect of silver ion, 1-naphthalene acetic acid and 6-benzylaminopurine on micropropagation of „Fastgate“ tree shape variety *Populus alba* cl. LBM, *Acta Hort*. 885: 197-202.
- Kovačević B., Tomović Z., Štajner D., Katanić M., Drekić M., Stojnić S. (2010b): Restoracija autohtonih vrsta topola (*Populus sp.*) u aluvijalnim područjima – formiranje genofonda, *Topola/Poplar* 185/186: 61-68.
- Kurkdjian, A., Mathieu, Y., Guern, J. (1982): Evidence for an action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the vacuolar pH of *Acer pseudoplatanus* cells in suspension culture. *Plant Sci. Lett.* 27: 77-86.
- Leifert, C., Murphy, K. P., Lumsden, P. J. (1995): Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures, *Crit. Rev. Plant Sci.* 14:83-109.
- Marx, M., Marschner, B., Nelson, P. (2002): Short-term effects of incubated legume and grass materials on soil acidity and C and N mineralisation in a soil of north-east Australia. *Aust. J. Soil Res.* 40: 1231–1241.
- Martin, S. M. (1980): In: Staba El (ed) *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Raton, p.143-148.
- Martins, N., Goncalves, S., Palma, T., Romano, A. (2011): The influence of low pH on in vitro growth and biochemical parameters of *Plantago almogravensis* and *P. algarbiensis*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 107: 113-121.
- Moseyko, N., Feldman, Lj. (2001): Expression of pH – sensitive green fluorescent in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 24: 557–563.
- Ostrolucká, M. G., Gajdošová, A., Ondrušková, E., Lateěková, M., Libiaková, G. (2010): Effect of medium pH on axillary shoot proliferation of selected *Vaccinium vitis-idaea* L. cultivars. *Acta Biol. Cracov. Bot.* 52: 92-96.
- Owen, H. R., Wengerd, D., Miller, A. R. (1991): Culture medium pH influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. *Plant Cell Rep.* 10: 583-586.
- Pelet, F., Hildebrandt, A. C., Riker, A. J., Skoog, F. (1960): Growth in Vitro of Tissues Isolated from Normal Stems and Insect Galls. *Amer J Bot* 47: 186–195
- Plieth, C., Sattelmacher B., Hansen, U. P., Knigh, M. R. (1999): Low pH – mediated in cytosolic calcium are inhibited by aluminium: A potential mechanisms for aluminium toxicity. *Plant J.* 18: 643 – 650.
- Rédei, K., Keserű, Z., Antal, B. (2013): Tending operation models for Leuce poplar stands growing on sandy soils in Hungary. *Topola* 191/192: 1-8.
- Rukshana, F., Butterly, C.R., Xu, J.M., Baldock, J.A, Tang, C. (2014): Organic anion-to-acid ratio influences pH change of soils differing in initial pH. *J Soils Sediments* 14:407–414.

- Ruzić, Dj., Cerovic, R. (2001): Changes in the pH value of the medium after autoclaving and during culture of sweet cherry rootstocks *in vitro*. Jugosl. Voćar. 35: 27- 37.
- Sarma, K.S., Maesato, K., Hara, T., Sonoda, Y. (1990): Effect of method of agar addition on post-autoclave pH of the tissue culture media. Ann. Bot. 65:37-40.
- Schenk, N., Hsiao, K.C., Bomman, C.H. (1991): Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant tissue culture media. Plant Cell Reports 10:115-119.
- Skirvin, R.M., Chu, M.C., Mann, M.L., Young, H., Sullivan, J., Fermanian., T. (1986): Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. Plant Cell Rep. 5: 292-294.
- StatSoft Inc. (2012): STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com.
- Street, H.E. (1969): Growth in organised and unorganised systems - knowledge gained by culture of organs and tissue explants. In: Steward F. C. (ed.) 1969. Plant Physiology - a Treatise. 5B. Academic Press, New York.: 3-224.
- Van Winkle, S.C., Johnson, S., Pullman, G.S. (2003): The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. Plant Cell Rep 21:1175–1182.
- Von Uexkull, R. H., Mutert, R. H. (1995): Global extent, development and economic impact of acid soils. Plant and Soil, 171: 1 – 15.
- Woodward, A.J., Bennett, I.J., Pusswonge, S. (2006): The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on *in vitro* shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*, Sci. Hort. 110: 208-213.
- Vuksanović, V. (2013): Procena tolerantnosti i mogućnost akumulacije bakra kod genotipova crne topole u uslovima *in vitro*. Master rad, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Vuksanović, V., Kovačević, B., Orlović, S., Kebert, M., Katanić, M. (2016a): Uticaj pH vrednosti podloge za ožiljavanje na rast i razvoj izbojaka belih topola u kulturi *in vitro*. Topola, 197/198: 51-63.
- Vuksanović, V., Kovačević, B., Orlović, S., Miladinović, D., Katanić, M., Kebert, M. (2016b): The effect of medium pH on white poplar shoots' growth *in vitro*. Books of proceedings of VII International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2016", Jahorina, Bosnia and Herzegovina, October 06-09 2016: 2868-2873.
- Vuksanović, V., Kovačević, B., Katanić, M., Orlović, S., Miladinović, D. (2017): *In vitro* Evaluation of Copper Tolerance and Accumulation in *Populus nigra*. Arch Biol Sci. 69(4): 679-687.
- Yan, F., Feuerle, R., Schaffer, S., Fortmeier, H., Schubert, S. (1998): Adaptation of Active Proton Pumping and plasmalemma ATPase Activity of Corn Roots to Low Root Medium pH. Plant Physiology, 117: 311 – 319.

### *Summary*

#### **CHANGES IN MEDIUM pH DURING WHITE POPLAR MICROPROPAGATION**

by

*Vanja Vuksanović, Branislav Kovačević, Saša Orlović, Dragana Miladinović, Marko Kebert, Marina Katanić*

*Changes in medium pH during the cultivation in vitro are of importance in optimization of micropropagation protocols, as well as in study of plant's reaction on certain medium characteristics. In this research the change of medium pH was examined after 35 days of cultivation in vitro of four white poplar (*Populus alba L.*) genotypes. Media with four different initial pH values were examined: 3.0, 4.0, 5.5 and 7.0 buffered with sodium citric buffer, as well as standard medium for micropropagation, with pH 5.5 and no citric acid added (Control). By medium sterilization in microwave oven the problems with gelification of medium on low pH were overcome.*

*Results of analysis of variance after 35 days of cultivation showed that the final medium pH and difference between final and initial medium pH were significantly influence by difference between media, and by interaction genotip × podloga as well, while the influence of genotypes was not statistically significant.*

*In total, significant differences in final medium pH and differences between final and initial medium pH were recorded in all examined media except for medium with initial pH 5.5. The increment of pH values was found on media with low initial pH (pH 3.0 and pH 4.0), while in the medium with initial pH 7.0 the change was negative. Results suggest that the changes lead to the establishment of one pH for that we assume that it might be optimal for the micropropagation of examined white poplar genotypes (cca. pH 5.5).*

*Gained results stress the importance of further research on influence and implementation of pH in white poplar tissue culture and use of presented methodology in evaluation of white poplar genotypes for their use in projects of melioration and phytoremediation.*