

Učinci natrij-hipoklorita (NaClO) i živinog (II) klorida (HgCl₂) na površinsku sterilizaciju pupova Oblačinske višnje u kulturi *in vitro*

Effects of sodium hypochlorite /NaClO/ and mercuric (II) chlorite /HgCl₂/ on surface sterilization of Oblačinska sour cherry buds in *in vitro* culture

**Ines Mihaljević, Vesna Tomaš, K. Dugalić, Zorica Jurković,
Marija Viljevac, B. Puškar, Ankica Pranjić**

SAŽETAK

U kulturi *in vitro* vrlo je važno pronaći odgovarajuće sredstvo koje će ukloniti bakterije i gljivice iz biljnog tkiva i stanice prije unošenja na podlogu. Stoga je površinska sterilizacija vrlo važan korak u pripremanju eksplantata.

U ovom radu istraživanje je rađeno na pupovima Oblačinske višnje kлона OS. Istraživano je djelovanje natrijevog hipoklorita (NaClO) i živinog (II) klorida (HgCl₂) u različitim koncentracijama i dužini trajanja sterilizacije pupova.

Pupovi su najprije sterilizirani sa 70% etanola, a nakon toga s NaClO koncentracije 1, 2 i 3% u trajanju od 20, 15 i 10 min te s HgCl₂ koncentracije 0.1, 0.5 i 1% u trajanju od 10, 5 i 2 min. Sterilizirani pupovi su inokulirani na hranjivu podlogu. Nakon mjesec dana utvrđen je broj kontaminiranih, propalih i zdravih biljčica. Najbolje rezultate pokazala je površinska sterilizacija sa 1% NaClO u trajanju od 20 min s 80% zdravih biljčica.

Ključne riječi: eksplantat, *in vitro* biljka, kontaminacija, Oblačinska višnja, sterilizacija

ABSTRACT

To obtain *in vitro* culture it is very important to find a solvent for removing bacterial and fungi from explant tissue. Surface sterilization is the most important step in preparation of explants. In the present study research was conducted on sour cherry cv. Oblačinska višnja, clone OS.

A comparison was made between sodium hypochlorite (NaOCl) and mercuric chloride (HgCl₂) with different times of buds sterilization. First, buds were sterilized with 70% of ethanol for few seconds and after that they were sterilized with sodium hypochlorite (concentration 1, 2, and 3%, for 20, 15 and 10 min.) and mercuric chlorite

(concentration 0.1, 0.5 and 1%, for 10, 5 and 2 min.) Sterilized explants were inoculated on culture medium. After one month the number of contaminated, collapsed and healthy plants was determinate. The best results were obtained by surface sterilization with 1% NaOCl with exposure of 20 min, with 80% healthy, survival plants.

Key words: contamination, explant, *in vitro* plant, Oblačinska višnja, sterilization

UVOD

Oblačinska višnja je ekotip koji se razvio i prilagodio ekološkim i edafskim uvjetima geografskog područja sela Oblačine te predstavlja veliku, heterogenu populaciju.

Razmnožava se prvenstveno vegetativnim putem odnosno izdancima. S obzirom da populacija oblačinske višnje predstavlja skup velikog broja klonova izvodi se klonska selekcija.

Jedan od problema u komercijalnoj *in vitro* proizvodnji je kontaminacija mikroorganizmima zbog čega može doći do propadanja kulture, smanjene proliferacije pupova, smanjenja rasta korijena i nekroze tkiva. Za dekontaminaciju eksplantata koriste se različita kemijska sredstva (George,1993) kao što su: natrijev hipoklorit (NaOCl), kalcijev klorit (Ca(ClO)₂) živin klorid (HgCl₂), srebrov nitrat (AgNO₃), vodikov peroksid (H₂O₂). Budući da su ta sredstva otrovna za biljno tkivo vrlo je važno prilikom upotrebe paziti na njihovu koncentraciju kao i na vrijeme izlaganja eksplantata određenom sredstvu.

Stoga su izbor dezinficijensa, njegova koncentracija i vrijeme trajanja dezinfekcije preduvjet za uspješnu sterilizaciju. Protokol sterilizacije je različit te ovisi o biljnoj vrsti kao i o eksplantatu biljke koji se koristi.

Biljke koje rastu u polju više su kontaminirane u odnosu na biljke koje rastu u plastenicima i klima – komorama.

U istraživanju su korištena dva najčešće korištena kemijska sredstva natrijev hipoklorit (NaOCl) i živin (II) klorid (HgCl₂) u različitim koncentracijama kako bi se ustanovila najučinkovitija površinska sterilizacija za pupove oblačinske višnje.

MATERIJAL I METODE

Za pokuse su korištene grančice koje su ubrane u voćnjaku Poljoprivrednog instituta Osijek, sa stabala Oblačinske višnje, klon OS. Prije sterilizacije grančice su se isprale vodom te su čuvane u laboratoriju par dana uronjene u vodu. Grančice s aksilarnim pupovima odrezane su na dužinu od 1 do 2 cm te su

sterilizirane sa 70% etanola nakon čega se provodila površinska sterilizacija s natrijevim hipokloritom (NaClO) koncentracije 1, 2 i 3% u trajanju od 20, 15 i 10 i živinim (II) kloridom (HgCl₂) koncentracije 0.1, 0.5 i 1 % u trajanju od 10, 5 i 2 min.

Pupovi su nakon toga isprani u destiliranoj vodi te je izoliran meristem s dva do tri primordijalna listića.

Pokus je postavljen u tri repeticije, za svaku repeticiju i način sterilizacije koristilo se po deset pupova. Nakon sterilizacije pupovi su inokulirani na sterilnu hranjivu podlogu (Murashige i Skoog, 1964.; Schenk i Hildebrandt, 1972.)

Inokulacija pupova se obavljala u strogo kontroliranim uvjetima laminara. Biljke su rasle u klima komori na 25°C, uz fotoperiodično osvjetljenje od 16 h pri intenzitetu osvjetljenja od 3500 luksa. Zabilježeni su postoci kontaminiranih, propalih i preživjelih pupova.

REZULTATI

Najbolji rezultati pokazali su se prilikom tretiranja s 1% NaClO u trajanju od 20 min. pri čemu se dobilo 80% zdravih biljaka (Tablica 1).

Kod sterilizacije s 0,1%-tnim HgCl₂ u trajanju od 10 min. s HgCl₂ dobilo se 66,6 % zdravih pupova.

Iz rezultata se može zaključiti da je najbolje sredstvo za dezinfekciju pupova Oblačinske višnje 1% NaClO u trajanju od 20 min.

Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Altaf-a (2006) gdje su oba sredstva za sterilizaciju pokazala slične rezultate, ali je sterilizacija s HgCl₂ pokazala veći broj kontaminiranih i propalih pupova.

Romano i sur.(1992.) ustanovili su da je HgCl₂ bolje sredstvo za sterilizaciju pupova *Quercus suber* L. od NaOCl.

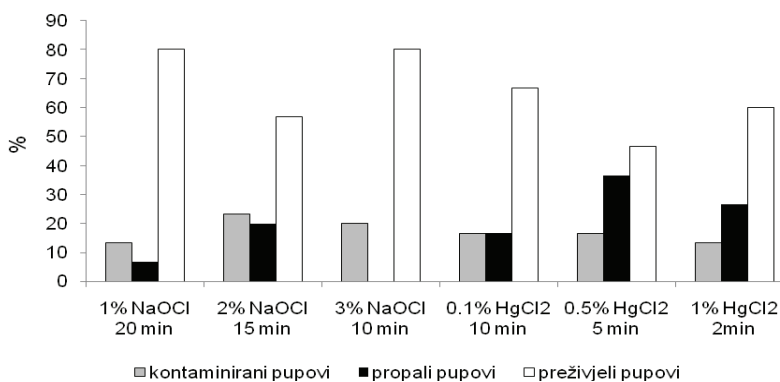
Iz dobivenih se rezultata također vidi da je puno veći postotak propalih pupova nakon sterilizacije s HgCl₂(kod većih koncentracija). Slični rezultati su dobiveni (Sedlak, 2008.) u istraživanju na pupovima trešnje gdje je 44% (Karešova) i 52% (Rivan) pupova nakon sterilizacije sa HgCl₂ propalo, što se povezuje s tim da je HgCl₂ jako sredstvo koje može biti otrovno za biljke (Muna i sur.,1999).

Badoni (2010) je zabilježio da je NaOCl bolje sredstvo od HgCl₂ za sterilizaciju *Solanum tuberosum* i da povećanjem trajanja sterilizacije s HgCl₂ dolazi do povećanja broja propalih eksplantata.

Tablica 1. Učinkovitost NaOCl i HgCl₂ na površinsku sterilizaciju pupova Oblačinske višnje

Table 1 Effects of NaClO and HgCl₂ on surface sterilization of Oblačinska sour cherry buds

SREDSTVO ZA DEZINFEKCIJU TRAJANJE DEZINFEKCIJE	KONTAMINIRANI PUPOVI %	PROPALI PUPOVI %	PREŽIVJELI PUPOVI %
1% NaClO trajanje 20 min.	13,33	6,66	80
2% NaClO trajanje 15 min.	23,33	20	56,6
3% NaClO trajanje 10 min.	20	/	80
0.1% HgCl ₂ trajanje 10 min.	16,66	16,66	66,66
0.5% HgCl ₂ trajanje 5 min.	16,66	36,66	46,66
1% HgCl ₂ trajanje 2 min	13,33	26,66	60



Grafikon 1. Površinska sterilizacija pupova oblačinske višnje s NaOCl i HgCl₂

Graph 1 Surface sterilization of Oblačinska cherry buds with NaClO and HgCl₂

ZAKLJUČAK

Oba sredstva za sterilizaciju pokazala su dobre rezultate u uspostavljanju aseptične kulture no ipak NaOCl je bolji sterilizant s većim postotkom preživjelih, nekontaminiranih pupova.

Stoga se za površinsku sterilizaciju pupova Oblačinske višnje preporuča 1% NaOCl u trajanju od 20 min., što nema štetne posljedice za biljku čak i kod dužeg tretiranja.

LITERATURA

- ALTAF N., 2006., In vitro bud culture of kinnow tree, Pak. J. Bot., 38(3): 597-601
- BADONI, A. AND CHAUHAN J.S., 2010., *In Vitro* Sterilization Protocol for Micropropagation of Solanum tuberosum cv. 'Kufri Himalini', Academia Arena 2(4)
- CEROVIĆ, R., RUŽIĆ, D., 1987., Micropropagation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cv. Šumadinka, Plant cell, Tissue and Organ Culture 9; 151-157
- DURKOVIČ, J., 2006., Rapid micropropagation of mature wild cherry, Biologia Plantarum 50 (4):733-736
- GEORGE, EDWIN F., 1993. Plant Propagation by Tissue Culture, Exegetics Ltd., Basingstoke, UK
- JELASKA S., 1994., Kultura biljnih stanica i tkiva, Školska knjiga Zagreb
- KYTE, L., KLEYN, J., 1996., Plants from test tubes, Timber press
- MURASHIGE T. I SKOOG F., 1962., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-97
- NIEDZ, R.P. I BAUSHER, M.G., 2002., Control of *in vitro* contamination of explants from green house and field grown trees. *In vitro Cell Dev. Biology – Plant*, 38: 468- 471.
- ROMANO, A. AND MARTINS-LOUQCAO, M.A., 1992., Micropropagation of mature cork-oak (*Quercus Suberi* L.): Establishment problems, Scientia genmdensis, 18: 17-27
- SEDLÁK, J., PAPRŠTEIN, F., 2008., *In vitro* shoot proliferation of sweet cherry cultivars Karešova and Rivan, Hort. Sci. (Prague), 35, (3): 95–98

SCHENK, R.H. I HILDEBRANDT, A.C., 1972., Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.

SMITH, R., 2000., Plant tissue culture, techniques and experiments,, Academic press

SRIVASTAVA, N., KAMAL, B., SHARMA, V., KUMAR NEGI, Y., DOBRIYAL, A.K., GUPTA S. & SINGH V. JADON, 2010. *In Vitro* Sterilization Protocol for Micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri Himalini', Academia Arena, 2(4)

Adrese autora – Author's addresses:

Ines Mihaljević,
Vesna Tomaš,
Krunoslav Dugalić,
Zorica Jurković,
Marija Viljevac
Poljoprivredni institut Osijek,
Južno predgrađe 17,
31000 Osijek, Croatia
e-mail: ines.pilizota@poljinoh.hr