

UDK 630*163:582.475 *Pinus heldreichii*
Оригинални научни рад

УТИЦАЈ СТАДИЈУМА РАЗВИЋА МЕГАГАМЕТОФИТА *Pinus heldreichii* НА ИНДУКЦИЈУ ЕМБРИОГЕНОГ ТКИВА

ДРАГАНА СТОЈИЧИЋ
СНЕЖАНА БУДИМИР
ДУШИЦА ЈАНОШЕВИЋ

Извод: Изоловане овуле *Pinus heldreichii* (Christ.) гајене су *in vitro* на хранљивим подлогама ради испитивања могућности индукције соматске ембриогенезе. Хранљива подлога Gresshoff and Doy (GD) са азотним једињењима, смањеним на половину и BA 0.5 mg/L и 2.4-D 2.0 mg/L, стимулисала је индукцију ембрионог ткива. Ипак, најважнији фактор у овом процесу био је стадијум развића ембриона у овули. Фреквенција индукције од 10% добијена је на овулама у којима су ембриони били у прекотиледонарном стадијуму развића. Када је доминантни ембрион у овули био у котиледонарном стадијуму развића, фреквенција индукције била је мања или је није ни било. Пролиферација ембрионог ткива добијена је на подлогама са смањеном концентрацијом регулатора растења, а почетни стадијуми сазревања ембриона на подлогама са АВА и 5% сахарозе.

Кључне речи: муника, незрела семена, овуле, соматска ембриогенеза.

EFFECT OF DEVELOPMENT STAGE OF *Pinus heldreichii* MEGAGAMETOPHYTES ON THE INDUCTION OF EMBRYOGENIC TISSUE

Abstract: The potential of somatic embryogenesis induction was examined by *in vitro* growing of isolated ovules of *Pinus heldreichii* (Christ.) on nutrient media. The induction of embryogenic tissue was stimulated by Gresshoff and Doy (GD) medium with nitrogen compounds reduced to one half and with 0.5 mg/l BA and 2.0 mg/l 2.4-D. Still, the most important factor in this process was the development stage of embryos in the ovule. An induction frequency of 10% was obtained on the ovules in which embryos were in the pre-cotyledonary stage. When the dominant embryo in the ovule was in the cotyledonary stage, the induction frequency was lower or absent. Proliferation of embryogenic tissue was achieved on the media with reduced concentration of growth regulators, and the initial stages of embryo maturation were obtained on the media with ABA and 5% sucrose.

Key words: white-bark pine, immature seeds, ovules, somatic embryogenesis.

1. УВОД

Муника *Pinus heldreichii* је терцијарни реликт и ендемит Балканског полуострва и малог подручја у јужној Италији. У прошлости шуме мунике су образовале простран и моћан шумски појас на Балкану који је, негативним антропогеним утицајима, сведен на веће или мање остатке. На месту овог појаса данас су голети, вегетација камењара и планински пашњаци (Јан ко-

др Драгана Стојичић, Институт за шумарство, Београд, др Снежана Будимир, Институт за биолошка истраживања „Синиша Спанковић“, Београд, др Душица Јаношевић, Институт за бојанику и бојаничка башиња “Јевремовац”, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, Таковска 43, Београд.

вић, М., 1991). Оваква деградација и нарушавање природе има за последицу разорно и често катастрофално дејство ерозије, бујица и лавина (Јанковић, М., 1972). Због тога је обнављање читавог високопланинског и планинског шумског појаса мунике један од најзначајнијих задатака примењене екологије и шумарства.

Муника изграђује горњу шумску границу, што значи да живи и у, за дрвеће, најтежим условима наших планина. Ипак, она је и тим неповољним условима добро прилагођена. Захваљујући добром укорјењавању, малим станишним и температурним потребама, ова врста бора расте на неприступачним и безводним кречњачким теренима (Јовановић, Б., 1971). Чак и на оваквим теренима стабло мунике је декоративно, са пирамидалном круном и тамнозеленом бојом четина. Зато се муника може користити и за пошумљавање предела уништених ерозијом или бујицом али и као украсно дрво. Муника показује виталност спонтаног обнављања. Потребно је једино да човек не омета ове природне процесе обнове. Наравно, тамо где је муника потпуно уништена неопходно је пошумљавање садницама произведеним у расадницима.

Семе мунике је дормантно. Вегетативно размножавање ожиљеницама је са slabим успехом па је процес добијања квалитетних садница отежан. Због тога је и започета примена алтернативних метода културе *in vitro* у намери да се муника вегетативно регенерише, и то кроз индукцију адвентивних пупољака (Stojičić, D. et al., 1999), кроз индукцију аксиларних пупољака (Stojičić, D. et al., 2004) и индукцију соматске ембриогенезе (Stojičić, D. et al., 2007).

Соматска ембриогенеза је процес који се одиграва *in vitro*, током кога соматске ћелије (ћелије вегетативних органа или хаплоидне микроспоре) формирају биполарне ембрионе. Формирање ембриона дешава се кроз серију процеса који су по општој шеми аналогни зиготској ембриогенези, тј., развоју ембриона *in vivo*. Једна ћелија, зигот, у случају зиготске ембриогенезе, или соматска ћелија у случају соматске ембриогенезе, развијају се у ембрион који представља нову индивидуу. Зигот је са промењеним а соматски ембрион са истим геномом као што је геном мајке. Осим генетичких разлика, присутне су и разлике које настају услед различитог окружења у коме се зиготски и соматски ембриони развијају. Зиготски ембрион је заштићен у семеном заметку, и у право време добија праву комбинацију хранљивих и стимулативних супстанци. Насупрот њему, соматски ембрион лежи на хранљивој подлози и његово развиће директно зависи од састава хранљиве подлоге. Соматски ембриони су од раних стадијума развића поларизоване структуре које имају формиран апикални меристем изданка и апикални меристем корена, и ни у једној фази развића не успостављају васкуларну везу са материнским ткивом (Ragha van, V., 1976). Број врста четинара код којих је соматском ембриогенезом добијена регенерација биљака је све већи. Ипак код великог броја врста рода *Pinus*, иако се примењују различити третмани, није могуће индуковати соматску ембриогенезу, па се за њих може рећи да су рекалцитрантне.

Резултати приказани у овом раду односе се на дефинисање стадијума развића мегагаметофита који је најподеснији за индукцију ембриогеног ткива, одржавање ембриогених линија и праћење развића соматских ембриона мунике.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Шишарице мунике прикупљене су са већег броја стабала са слободним опрашивањем на природном локалитету на планини Ловћен у Црној Гори. Прикупљање је обављено 26.06., 02.07., 10.07. и 17.07.2007. год. Шишарице су чуване на температури од 4 ~С до дана коришћења, а најдуже два месеца. На дан коришћења семена су изолована из шишарица, а затим су 24 h испирана под текућом водом. Након испирања семена су 30 минута стерилисана 20%-тном варикином (комерцијални назив натријум хипохлорита са 60g активног хлора/L). Стерилисана семена су затим три пута испрана стерилном дестилованом водом и из њих су у стерилним условима изоловане незреле овуле. Овуле су постављане на **индуктивне подлоге**: хранљиву подлогу Gresshof, P.M. and Doy, C.H. (1972) – GD, модификовану од стране Sommer-a и dr. (1975); GD подлогу са смањеним азотним једињењима на половину – GDa; GD подлогу са редукованим азотним једињењима – GDb. Свакој од подлога додани су регулатори растења: 2.4-дихлорофенокси-сирћетна киселина (2.4-D) и 6-бензил-аминопурин (BA) или 1-нафтил-сирћетна киселина (NAA) и BA (табела 1). Сваки третман је обухватио по 30 овула, по 10 у Петријевој кутији, у два понављања. Индуктивни период је трајао 5 дана. Овуле су затим пренете на **подлоге за пролиферацију** ембриогеног ткива. Ове подлоге су биле истог минералног састава као и индуктивне подлоге али са регулаторима растења смањеним на петину. Овуле са ембриогеним ткивом преношене су на свеже хранљиве подлоге сваке 4 недеље. Ткиво је одржавано на овим подлогама 8-20 недеља. Ембриогено ткиво са ембрионима је преношено на **подлоге за сазревање ембриона**. Ове подлоге су биле истог минералног састава уз садржај абсцисинске киселине у концентрацијама 1.6, 3.2 или 5 mg/L. На подлогама за сазревање ембриогено ткиво је гајено 4 недеље, а затим је преношено на подлоге истог састава без регулатора растења. Хранљиве подлоге су садржале 3% сахарозе (осим у случају подлоге за сазревање где је коришћена и 5%) и 0.7% агара (Торлак, Београд), рН подлога била је 5.7 пре аутоклавирања, на 115 °С, у трајању од 25 мин.

Културе су гајене у мраку на температури од 25 ± 2 °С током индуктивне и пролиферативне фазе а током фазе сазревања ембриона под флуоресцентном светлошћу, при фотопериоду од 16 сати светлости и 8 сати мрака. Густина флукса светлости којом су биле осветљене културе на полици била је $47 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$. Густина светлосног флукса мерена је инструментом Quantum Sensor Li-190 SA уз Li-100 Datalogger (Lincoln-Nebraska, USA). Ради анализе ембриогеног ткива, под светлосним микроскопом припремљени су привремене “сквош” препарати. Делови ембриогеног ткива су пренети у 2%-тни раствор ацетокармина и благо загрејани 15 секунди на пламену шпиритусне лампе. Материјал је затим испран дестилованом водом неколико пута. Ткиво је након тога обојено 0,05%-тним воденим раствором Еванс плавог и испрано дестилованом водом неколико пута. Обојено ембриогено ткиво је прекривено глицерином и покровном плочицом ради добијања танког слоја - “сквош” препарата, који је погодан за анализу светлосним микроскопом.

Табела 1- Састав хранљивих подлога у различитим фазама развића ембриогеног ткива

Table 1- Composition of nutrient media in different development phases of embryogenic tissue

	Иницијација	Пролиферација	Сазревање
Пасажи	1	2-5	1
Хранљива подлога	GD; GDa; GDb.	GD; GDa; GDb.	GD; GDa; GDb.
Сахароза (g/L)	30	30	30; 50.
Регулатори растења (mg/L)			
ВА	0.5	0.1	
2.4 – D или NAA	2.0	0.5	
АВА			1,6; 3,2; 5.
Светлосни режим	мрак	мрак	светлост
Време	5 дана	8-20 недеља	4 недеље

3. РЕЗУЛТАТИ

Незреле шишарице мунике прикупљане су сваких седам дана од 26. јуна до 17. јула 2007.год. Незрела семена садржала су овулу окружену меканом семењачом. У овулама семена која су прикупљена 26. јуна доминантни зиготски ембриони су били углавном у прекотиледонарном стадијуму развића. У овулама из семена прикупљених 02. и 10. јула доминантни зиготски ембриони били су у прекотиледонарном и котиледонарном стадијуму развића, а у овулама, које су изоловане из семена прикупљених 17. јула, углавном у котиледонарном стадијуму развића.

На индуктивним подлогама овуле су гајене пет дана (сл. 1а), а затим су пренете на подлоге у којима је концентрација регулатора растења смањена на петину. Преношењем на подлоге са смањеном концентрацијом регулатора растења долазило је до повећања волумена овула, до пуцања микропиларног дела овула и до појављивања муцилагеног калуса пореклом из суспензорског региона ембриона (сл. 1б). Овај калус је ембриогени и састављен је од великог броја соматских ембриона на раним ступњевима развића. Ово ткиво стално пролиферује и формира нове ембрионе, па се на “сквош” препаратима могу уочити ембриони у различитим фазама развића.

Ембриогени калус индукован је код 3-10% овула мунике које су прикупљене 26. јуна. У експериментима са овулама прикупљеним касније, индукција ембриогеног ткива дешавала се ређе или је није ни било. Највише овула, 10%, индуковано је када је подлога садржала смањену концентрацију једињења азота и регулаторе растења 2.4-D 2 mg/L и ВА 0,5 mg/L (табела 2). Пролиферација ткива је праћена при сваком пасажирању и установљено је да су линије пореклом од прекотиледонарног стадијума развића ембриона виталније и да након више пасажирања не губе свој ембриогени потенцијал, напротив, рапидно расту. Ембриогене линије Б и Ц су изгубљене већ након другог пасажирања.

Ембриогено ткиво било је састављено од великог броја ембриона у раним фазама развића и оно је пролиферовало на подлогама са умањеним концентрацијама регулатора растења. По целој површини ембриогеног тки-

ва издвајају се појединачни соматски ембриони. Анализом „сквош“ препарата ембриогеног ткива, утврђено је да су ембриони организовани као биполарне структуре са меристемским ћелијама на дисталном и суспензором са дугачким вакуолизованим ћелијама на проксималном крају (сл. 1в). Меристемске ћелије су изодијаметричне, густо збијене, садрже густу цитоплазму, мале вакуоле и централно постављено једро. Ћелије суспензора су издужене, са великом вакуолом, која је централно постављена, и танким слојем цитоплазме који се налази уз ћелијски зид.

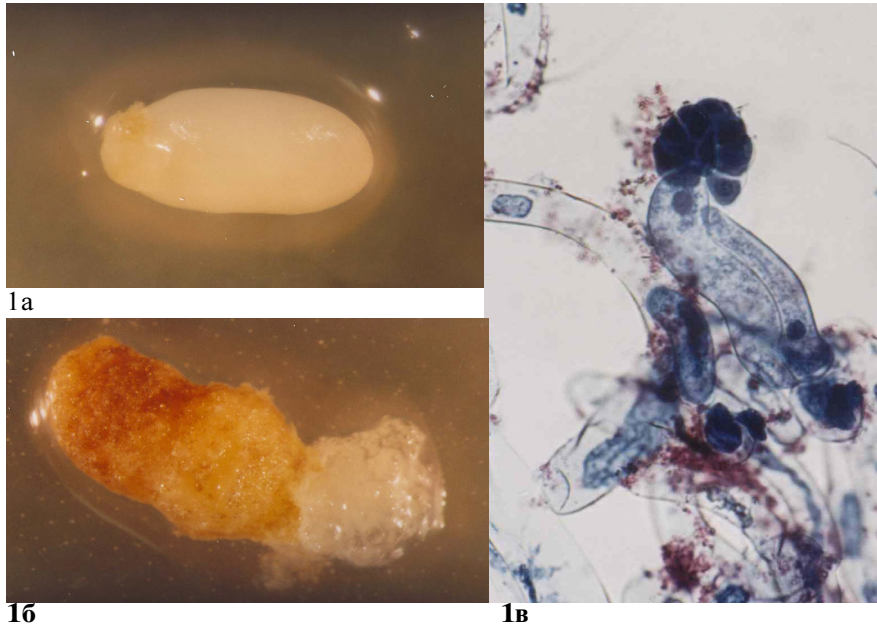
Табела 2- Индуција ембриогеног ткива на овулама мунике различитих старости. После индуктивног третмана у трајању од 5 дана експлантација су преношени на подлоге истог минералног састава са смањеном концентрацијом регулатора раста на медиуму

Table 2- Induction of embryogenic tissue on white-bark pine ovules of different ages. After the inductive treatment for 5 days, explants were transferred to media of the same mineral composition with a five times lower concentration of growth regulators

Хранљива подлога	Хормони (индуција)	Овуле са ембриогеним ткивом (%)			
		А(26.06.)	Б(02.07.)	Ц(10.07.)	Д(17.07.)
GD	2 mg/l 2.4-D+0,5 mg/l BA	6.67	3.33*	-	-
	2 mg/l NAA+0,5 mg/l BA	3.33	-	-	-
GDa	2 mg/l 2.4-D+0,5 mg/l BA	10.00	3.33*	3.33*	-
	2 mg/l NAA+0,5 mg/l BA	6.67	-	-	-
GDb	2 mg/l 2.4-D+0,5 mg/l BA	3.33	-	-	-
	2 mg/l NAA+0,5 mg/l BA	3.33*	3.33*	-	-

*културе које су изгубиле виталност после 8-10 недеља

Сваке четврте недеље ембриогено ткиво је преношено на свежу хранљиву подлогу, јер је ткиво интензивно расло и увећавало своју масу. Стално преношење ембрионалног ткива на свеже хранљиве подлоге било је неопходно да би се задовољиле потребе ткива за свежим саставом хранљиве подлоге али и спречило ширење некрозе ткива. Неке ембриогене линије су уз редовно пасажирање одражаване у култури дуже, а неке краће, јер су изгубиле ембриогену способност (табела 2). На подлогама са цитокинином и ауксином долазило је до сталног формирања нових ембриона али не и њиховог сазревања. Ради сазревања ембриогено ткиво са ембрионима у каснијим фазама развића преношено је на подлоге са абсцисинском киселином. Током наредних недеља долазило је до заустављања пролиферације ембриогеног ткива и услед интензивних ћелијских деоба до увећања ембриона, што су почетне фазе сазревања ембриона. Рад на даљем сазревању соматских ембриона је у току.



Слика 1- а) Ојлођена овула мунике; б) ембриогено ткиво на микропиларном крају овуле; в) соматски ембрион биполарне структуре, са меристемским ћелијама на дисталном и суспезором са дугачким вакуолизираним ћелијама на проксималном крају.
 Figure 1- a) Fertilised white-bark pine ovule; b) embryogenic tissue on the micropyle end of the ovule; v) somatic embryo of bipolar structure, with meristematic cells on the distal end and the suspensor with long vacuolated cells on the proximal end.

4. ДИСКУСИЈА

Под одговарајућим условима, од малог почетног ткива могуће је добити, хипотетички неограничену количину идентичних ембриона (Gupta, P.K. et al., 1993), тако да соматска ембриогенеза постаје све важнији метод пропације. Процес соматске ембриогенезе код четинара обухвата неколико карактеристичних фаза: индукцију и формирање ембриогеног ткива, одржавање и мултипликацију ембриогеног ткива, сазревање и клијање ембриона, и на крају, аклиматизацију биљака на услове стакларе а затим и на услове спољашње средине. Свака од ових фаза различито временски траје код различитих врста. Иако се број врста рода *Pinus* на којима је индукција соматске ембриогенезе постигнута из дана у дан повећава, главни проблеми и даље остају нерешени а то су: ниска фреквенција индукције ембриогеног ткива, немогућност сазревања ембриона и тешкоће приликом конверзије ембриона у биљку (Stassola, C. et al., 2002).

Постојање већег броја незрелих ембриона у овули четинара је веома значајно јер истраживачи најчешће користе целу овулу као експлантат за индукцију соматске ембриогенезе. Незрела овула је погодна за индукцију соматске ембриогенезе само ако се налази у одређеном стадијуму развића.

Према литературним наводима оптимално време за иницијацију ембриогеног ткива је прекотиледонарни стадијум развића доминантног ембриона у овули (Весквар, М.Р. et al., 1990). Међутим, и правилан избор експлантата ограничен је временом у току кога је могуће утицати на постојећи програм диференцијације ћелија експлантата и променити правце морфогенезе. Овај период може бити врло кратак, само пар дана или недеља (Весквар, М.Р. et al., 1991).

Ембриогени калус индукован је код 3-10% овула мунике, овако ниска фреквенција формирања ембриогеног калуса карактеристична је и за већину других *Pinus*-а (Gupta, Р.К., 1995; Salajova, Т. et al., 1999). Редукијом азотних једињења из хранљиве подлоге проценат овула мунике на којима је индукован ембриогени калус био је већи него када су овуле гајене на подлози са релативно високом концентрацијом азотних једињења (оригинална рецептура GD хранљиве подлоге) или на подлози у којој азотних једињења уопште нема. На подлози са редукованом концентрацијом амонијум нитрата било је успешније и гајење ембриогеног калуса *P. strobus* (Kaul, К., 1995). Ипак, уочава се да значајнији удео у индукцији ембриогеног ткива има стадијум развића овуле него састав хранљиве подлоге. Иако има примера да је индукција код неких врста рода *Pinus* могућа без регулатора растења (Весквар, М.Р. et al., 1990), за индукцију соматске ембриогенезе на овулама мунике регулатори растења били су неопходни. На подлози са редукованом концентрацијом амонијум нитрата и 2 mg/l 2.4-D + 0,5 mg/l ВА, индукција ембриогеног ткива била је успешнија као и пролиферација ткива и касније сазревање ембриона.

Преношењем ембриогеног ткива на подлоге у којима је концентрација регулатора растења смањена дошло је до интензивне пролиферације ткива. Код различитих четинара утврђено је да ембриогено ткиво, без обзира на којој врсти експлантата је индуковано, не може да расте ако се не пренесе на подлогу са редукованим нивоом регулатора растења (Весквар, М.Р. et al., 1990). Неке ембриогене линије мунике су уз редовно пасажирање одражаване у култури дуже, неке краће, јер су изгубиле ембриогену способност. Разлози леже у генетичкој варијабилности природних популација, што утиче на успех индукције соматске ембриогенезе, па се дешава да се код појединих генотипова са успехом индукује соматска ембриогенеза док су други генотипови рекалцитрантни (Puliman, G.C. et al., 2003).

Сазревање соматских ембриона код врста рода *Pinus* је критичан момент у успешној соматској ембриогенези. За сазревање соматских ембриона углавном је неопходно присуство АВА у подлози, а најважнији фактор у овом процесу је селекција одговарајућег развојног стадијума ембриогеног ткива (Puliman, G.C. et al., 2003). У неким случајевима је висока концентрација АВА била одговарајућа за сазревање ембриона (Salajova, Т. et al., 1999), а некада је за сазревање соматских ембриона разних борова потребно применити различите претретмане. Све више се користи активни угљ ради уклањања претходно коришћених цитокинина и ауксина, за које се оправдано претпоставља да инхибирају сазревање ембриона (Gupta, Р.К. et al., 1993). Међутим, на подлози са активним угљем долази до дезинтеграције ембриогеног ткива мунике на појединачне ћелије и процес ембриогенезе се зауставља.

На ембриогеном ткиву мунике које је пренето на подлогу са АВА уочавале су се извесне промене које су указивале на сазревање ембриона. Међу-

тим, потпуно сазревање још увек није постигнуто. У току је испитивање стадијума развића соматских ембриона који би био најоптималнији за преношење на подлоге за сазревање.

5. ЗАКЉУЧЦИ

У овом раду дефинисани су услови при којима долази до индукције соматске ембриогенезе у култури *Pinus heldreichii*. Незрела овула у одређеном стадијуму развића је најпогоднији експлантат за индукцију соматске ембриогенезе. Према резултатима оптимално време за иницијацију ембрионог ткива је прекотиледонарни стадијум развића доминантног ембриона у овули. Састав хранљиве подлоге, посебно присуство регулатора растења и контролисани услови средине, у сваком тренутку су важни фактори неопходни за успешну индукцију и пролиферацију ембрионог ткива. Почетни стадијуми сазревања соматских ембриона постигнути су на подлози са АВА.

Соматска ембриогенеза као једна од метода клоналне пропагације може бити значајна помоћ у решавању проблема заштите и очувања ендемо-реликтне врсте *Pinus heldreichii*, али и подизања квалитета и квантитета производње садница ове врсте.

Захвалница

Израду овог рада финансирало је Министарство науке Републике Србије у оквиру пројекта бр. 143026Б.

ЛИТЕРАТУРА

- Beckwar, M. R., Blush, T. D., Brown, D. W., Chesick, E. E. (1991): Multiple paternal genotypes in embryogenesis tissue derived from individual immature loblolly pine seeds. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 26: 37-44.
- Beckwar, M. R., Nagmani, R., Wann, R. S. (1990): Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.* 20: 810-817.
- Gresshoff, P.M. & Doy, C.H. (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Planta* 107: 161-170.
- Gupta, P. K., Pullman, G., Timmis, R., Kreitingner, M., Carlson, W. C., Grob, J., Welty, E. (1993): Forestry in the 21st Century: Biotechnology of somatic embryogenesis. *Bio-Technology* 11: 454-459.
- Gupta, P. K. (1995): Somatic embryogenesis in sugar pine (*Pinus lambertiana* Dougl.). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Vol. 3, 197-205. S. Jain, P. Gupta, R. Newton (Ed). Kluwer Academic Publishers.
- Јанковић, М. (1991): О веома значајној потреби успостављања континуираног вегетацијског појаса ендемореликтних балканских борова *Pinus heldreichii* и *Pinus peuce* на планинама СР Србије и балканског полуострва. *Екологија* 26: 61-67.
- Јанковић, М. (1972): Преглед асоцијација муникових шума (*Pinetum heldreichii*) у Југославији. Симпозијум о муници, Зборник радова, стр. 146-158.
- Јовановић, Б. (1971): Дендрологија са основама фитоценологије. Научна књига, Београд, стр. 123-127.

- Kaul, K. (1995): Somatic embryogenesis in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol. 3, 257-268. S. Jain, P. Gupta, R. Newton (Ed). Kluwer Academic Publishers.
- Pullman, G. S., Johnson, S., Peter, G., Cairney, J., Xu, N. (2003): Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Reports* 21: 747-758.
- Raghavan, V. (1976): Adventive embryogenesis: Induction of diploid embryoids. *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*. Academic Press, London.
- Salajova, T., Salaj, J., Kormutak, A. (1999): Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. *Plant Science* 145: 33-40.
- Sommer, H. E., Brown, C. L., Kormanik, P. P. (1975). Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue culture *in vitro*. *Bot. Gaz.* 136, 196-200.
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E., Thorpe, T. A. (2002). Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38, 93-105.
- Stojičić, D. and Budimir, S. (2004). Cytokinin-mediated axillary shoot formation in *Pinus heldreichii*. *Biol. Plant.* 48, 477-479.
- Stojičić, D., Budimir, S., Čulafić, Lj. (1999). Micropropagation of *Pinus heldreichii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 59, 147-150.
- Stojičić, D., Uzelac, B., Janošević, D., Čulafić, Lj., Budimir, S. (2007). Induction of somatic embryogenesis in *Pinus heldreichii* culture. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 59 (3), 199-202.

EFFECT OF DEVELOPMENT STAGE OF *Pinus heldreichii* MEGAGAMETOPHYTES ON THE INDUCTION OF EMBRYOGENIC TISSUE

Dragana Stojičić
Snežana Budimir
Dušica Janošević

Summary

The induction of somatic embryogenesis was achieved in the culture of immature ovules of endemic-relic species *Pinus heldreichii*. Isolated ovules with zygotic embryos in different stages of development were grown on nutrient medium with auxins and cytokinins. The induction of embryogenic tissue of 10% was achieved by growing the ovules with zygotic embryos in the pre-cotyledonary phase of development on the Gresshoff and Doy (GD) medium with reduced nitrogen compounds and growth regulators 0.5 mg/l BA and 2.0 mg/l 2,4-D. Proliferation of embryogenic tissue was obtained on the media with reduced concentration of growth regulators, and the initial stages of embryo maturation were obtained on the media with ABA and 5% sucrose. The analysis of microscopic preparations of embryogenic tissue shows that the tissue consists of a high number of densely interwoven embryos with meristematic cells on the distal end and the suspensor with long vacuolated cells on the proximal end. Further research of the effects of different treatments on the maturation of somatic embryos is underway, with a view of making the somatic embryogenesis an additional measure in solving the issues of white-bark pine protection and preservation.