

Mikropropagacija sorte višnje Čačanski rubin (*Prunus cerasus* L.)

Tatjana Vujović¹, Đurđina Ružić¹, Radosav Cerović²

¹Institut za voćarstvo, Kralja Petra I/9, 32000 Čačak, Srbija

E-mail: tatjanal@ftn.kg.ac.rs

²Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija

Primljeno: 26. mart, 2013; prihvaćeno: 22. jul, 2013.

Rezime. U radu je prikazan protokol za mikropropagaciju sorte višnje Čačanski rubin (*Prunus cerasus* L.) stvorene u Institutu za voćarstvo u Čačku. U cilju razvijanja protokola za brzu i efikasnu mikropropagaciju ovog genotipa ispitana je promena regenerativne sposobnosti *in vitro* izdanaka tokom supkultivisanja, kao i uticaj promene vrste i koncentracije biljnih regulatora rastjenja na fazu multiplikacije i ožiljavanja.

Primenom standardne metode površinske sterilizacije početnih eksplantata uspostavljena je aseptična kultura i inicirane lisne rozete na Murashige i Skoog (1962) (MS) hranljivoj podlozi sa 2,0 mg l⁻¹ BAP, 0,5 mg l⁻¹ IBA i 0,1 mg l⁻¹ GA₃. Po uspostavljanju aseptične kulture izdanci su multiplicirani u pet uzastopnih supkultura na MS hranljivoj podlozi koja je sadržavala 0,5 mg l⁻¹ BAP u kombinaciji sa po 0,1 mg l⁻¹ IBA i GA₃. Praćeni su sledeći parametri: indeks multiplikacije, dužina osovinskog i bočnih izdanaka. U cilju optimizacije faze multiplikacije, u 5. supkulturi je ispitana promena koncentracije BAP i/ili vrste auksina (IBA ili NAA) na parametre multiplikacije, svežu i suhu masu izdanaka. Utvrđeno je da se supkultivisanjem smanjila regenerativna sposobnost izdanaka prikazana kroz indeks multiplikacije u odnosu na prvu supkulturu (3,11), što je, međutim, bilo praćeno povećanjem rastjenja izdanaka, tako da je najveća prosečna dužina osovinskog izdanka (1,22 cm) utvrđena u petoj supkulturi. Iako je povećanje koncentracije BAP sa 0,5 na 1,0 mg l⁻¹ i promena vrste auksina (NAA umesto IBA) u petoj supkulturi dovelo do povećanja indeksa multiplikacije, zbog značajnog smanjenja dužine, kao i pojave hiperhidričnosti multiplicirani izdanci nisu bili pogodni za dalje gajenje.

Sorta Čačanski rubin je pokazala nizak kapacitet za ožiljavanje na hranljivoj podlozi bez biljnih regulatora rastjenja, kao i na hranljivoj podlozi sa 1,0 mg l⁻¹ IBA koji je najčešće korišćen auksin za ožiljavanje vrsta roda *Prunus*, dok na hranljivoj podlozi sa istom koncentracijom NAA nije uočeno ožiljavanje. Najveći procenat ožiljavanja (60,0%) i prosečan broj korenova po ožiljenoj biljci (6,3) postignut je gajenjem na hranljivoj podlozi bez biljnih regulatora rastjenja uz pretretman uranjanja bazalnog dela izdanaka u rastvor NAA (500 mg l⁻¹).

U uslovima „mist“ izmaglice procenat aklimatizacije izdanaka ožiljenih *in vitro* (55,6%) je bio značajno veći u odnosu na neožiljene izdanke (14,8%), kojima je prethodila indukcija rizogeneze.

Cljučne reči: višnja, aseptična kultura, multiplikacija, ožiljavanje, aklimatizacija

Uvod

Mikropropagacija je našla najširu praktičnu primenu od svih *in vitro* tehnika u voćarstvu, tako da je postala standardni način razmnožavanja za mnoge vrste voća-

ka, naročito za vegetativne podloge i jagodaste vrste voćaka. Opravdanost ove metode u voćarstvu je potvrđena i činjenicom da se poslednjih godina sve više koriste sistemi guste sadnje za koje je neophodno korišćenje ne samo slabo bujnih vegetativnih podloga, već

i sadnica (sorti) na sopstvenom korenu (Ružić & Cerović, 2003). Ova savremena metoda vegetativnog razmnožavanja ima mnogobrojne prednosti u odnosu na konvencionalne metode razmnožavanja u voćarstvu. Njen osnovni cilj je masovna produkcija genetički identičnih, fiziološki uniformnih i zdravih biljaka, koje mogu biti proizvedene u kratkom periodu vremena. Pored toga ova metoda je pogodna za brzo uvođenje novostvorenih sorti i hibrida u proizvodnju, može se koristiti kod biljaka koje se teško razmnožavaju drugim metodama vegetativnog razmnožavanja, ali i za eliminaciju patogena, odnosno dobijanje zdravog sadnog materijala oslobođenog virusa, bakterija i gljiva, kao i za dugo čuvanje klonskog materijala putem tehnika „cold storage” i krioprezervacije (Ružić *et al.*, 2009).

Prema Tantos *et al.* (2001) mikropropagacija drvenastih vrsta je vrlo često problematična zbog genotipske specifičnosti regenerativnog kapaciteta. Optimizacija mikropropagacije se bazira na izučavanje uticaja velikog broja različitih faktora koji regulišu rastenje, razvike i morfogenezu *in vitro*: biljni regulatori rastenja, mineralna ishrana, šećeri, gelirajući agensi, vitamini, pH vrednost medijuma, uslovi gajenja *in vitro* (temperatura, intenzitet svetlosti na površini kultura, fotoperiod), dužina i frekvencija supkultivisanja i dr. Sprovedena istraživanja su pokazala da, kako biljne vrste i sorte pokazuju visoku genotipsku specifičnost u odnosu na pomenute faktore, ne postoji mogućnost definisanja univerzalne hranljive podloge za gajenje biljaka *in vitro* (Ružić, 1998).

Polazeći od činjenice da je efikasnost regeneracije i multiplikacije u kulturi *in vitro* prevashodno determinisana odnosom genotip/sadržaj biljnih regulatora rastenja u hranljivoj podlozi, prvi korak ka uspešnoj primeni tehnika klonskog *in vitro* razmnožavanja biljaka, naročito u komercijalnim *in vitro* laboratorijama, je upravo utvrđivanje optimalnog sadržaja biljnih regulatora rastenja u hranljivim podlogama za indukciju morfogenskih procesa *in vitro*. U okviru roda *Prunus* proučavanja uticaja vrste i koncentracije biljnih regulatora rastenja na fazu multiplikacije i ožiljavanja sprovedena su kod velikog broja sorti (Cerović & Ružić, 1987; Ružić, 1989; Durković, 2006; Ružić & Vujović, 2008) i vegetativnih podloga za trešnju i višnju (Ružić, 1998; Hepaksoy, 2004; Dziedzic & Malodobry, 2006; Ružić *et al.*, 2007; Sedlak *et al.*, 2008; Buyukdemirci, 2008) i dr. Najčešće korišćen citokinin

u mikropropagaciji predstavnika ovoga roda je N6-benzil-aminopurin (BAP), i u mnogim istraživanjima se pokazao kao efikasniji od drugih citokinina koji pripadaju grupi purinskih derivata kao što su N6-(2-izopentil)-adenin, ili kinetin (Muna *et al.*, 1999; Ružić & Vujović, 2008), ili i od sintetičkih fenilurea derivata kao što je tidiazuron (Ružić & Vujović, 2008; Sedlak & Paprštein, 2008).

U ovom radu je prikazan protokol za mikropropagaciju sorte višnje Čačanski rubin stvorene u Institutu za voćarstvo u Čačku. U cilju razvijanja protokola za brzu i efikasnu mikropropagaciju ovog genotipa posebna pažnja je posvećena ispitivanju promene regenerativne sposobnosti *in vitro* izdanaka tokom supkultivisanja, kao i uticaja promene vrste i koncentracije biljnih regulatora rastenja na faze multiplikacije i ožiljavanja.

Materijal i metode

Biljni materijal i uspostavljanje aseptične kulture. Sorta višnje Čačanski rubin (*Prunus cerasus* L.) je nastala ukrštanjem sorti Shasse Morello x Köröser Weichsel. Stvorena je u Institutu za voćarstvo u Čačku 1960. godine, a za sortu je priznata 1973. godine.

Grančice višnje sa pupoljcima u fazi mirovanja vegetacije (januar–februar) su odsecane i postavljane na kretanje u laboratorijskim uslovima, na sobnoj temperaturi. Po aktivaciji, lateralni i apikalni pupoljci su skidani sa grančica i korišćeni kao početni eksplantati. Vršena je standardna procedura površinske sterilizacije: ispiranje eksplantata u protočnoj vodi (1,5–2 h), zatim u 70% etanolu (1 min i 20 sec), 10% varikini (12 min) i 3 puta u sterilnoj vodi. Pupoljci, veličine 0,3–0,8 cm, su izolovani pod stereomikroskopom i postavljani na MS hranljivu podlogu (Murashige & Skoog, 1962) sa 2,0 mg l⁻¹ BAP, 0,5 mg l⁻¹ indol-3-buterne kiseline (IBA) i 0,1 mg l⁻¹ gibberelne kiseline (GA₃), 7 g l⁻¹ agara i 20 g l⁻¹ saharoze (pH 5,7). Praćeni su sledeći parametri uspešnosti uspostavljanja aseptične kulture: procenat početnih eksplantata koji su inicirali rozetu, kao i procenat kontaminiranih i nekrotiranih eksplantata.

Faza multiplikacije in vitro. Po uspostavljanju aseptične kulture, odnosno indukciji rozete, izdanci su multiplikirani u pet uzastopnih supkultura na MS hranljivoj podlozi koja je sadržavala 0,5 mg l⁻¹ BAP u kombinaciji sa po 0,1 mg l⁻¹ IBA i GA₃. Praćeni su sledeći pa-

rametri: indeks multiplikacije, dužina osovinskog i bočnih izdanaka. U cilju optimizacije faze multiplikacije, odnosno utvrđivanja optimalnog sastava biljnih regulatora rastenja u hranljivoj podlozi, u 5. supkulturi su ispitane još tri kombinacije biljnih regulatora rastenja (Tab 1). Sve hranljive podloge su sadržavale agar i saharozu u koncentraciji od 7, odnosno 20 g l⁻¹, resp. Izdanci su dva puta supkultivisani na hranljivu podlogu istog hormonskog sastava, pa su svi praćeni parametri determinisani u 2. supkulturi koja je trajala 20 dana. Praćeni su parametri multiplikacije ali i specifične pojave, kao što su konzistencija i boja kalusa, obojenost i položaj listova, pojava hloroze, nekroze i dr. Takođe je merena sveža i suva masa izdanaka, odnosno njihovih delova, kalusa, stabla i listova. U svrhu određivanja suve mase izdanci su sušeni 48 h na 65 °C. Za svaku ispitanu kombinaciju biljnih regulatora rastenja u hranljivoj podlozi, postavljeno je 48 uniformnih izdanaka (6 Erlenmeyer posuda x 4 izdanka x 2 ponavljanja).

Faza ožiljavanja in vitro. U fazi ožiljavanja korišćena je MS hranljiva podloga sa mineralnim solima smanjenim na ½, organskim kompleksom nepromenjenim po MS, 7 g l⁻¹ agara, 20 g l⁻¹ saharoze bez biljnih regulatora rastenja (hormon free – HF hranljiva podloga), a ispitan je i uticaj vrste auksina u hranljivoj podlozi, kao pretretmana kojima su izdanci bili izlagani pre postavljanja na ožiljavanje (Tab. 2). Supkultura je trajala 28 dana, a praćeni su sledeći parametri: procenat ožiljavanja, prosečan broj i dužina korenova i dužina ožiljenih biljaka. Na svaku hranljivu podlogu za ožiljavanje je postavljeno po 40 izdanaka (4 Erlenmeyer posude x 5 izdanaka x 2 ponavljanja).

Faza ex vitro aklimatizacije. Izdanci ožiljeni *in vitro*, ali i neožiljeni izdanci su sađeni u sterilan zemljišni supstrat i aklimatizovani pod „mist” sistemom u staklari. Procenat aklimatizovanih biljaka je utvrđivan 7 dana posle sadnje, odnosno iznošenja biljaka u *ex vitro* uslove.

Tab. 1. Vrste i koncentracije biljnih regulatora rastenja u MS hranljivoj podlozi korišćene u fazi multiplikacije u petoj supkulturi kod sorte višnje Čačanski rubin

Type and concentration of plant growth regulators in MS medium used in multiplication stage (fifth subculture after initiation) in sour cherry 'Čačanski Rubin'

Oznaka hranljive podloge za multiplikaciju <i>Designation of medium for multiplication</i>	Biljni regulatori rastenja <i>Plant growth regulators (mg l⁻¹)</i>			
	BAP	IBA	NAA	GA ₃
M1	0,5	0,1	–	0,1
M2	0,5	–	0,1	0,1
M3	1,0	0,1	–	0,1
M4	1,0	–	0,1	0,1

Tab. 2. Hormonski sastav hranljivih podloga i vrste pretretmana u fazi ožiljavanja sorte višnje Čačanski rubin

Hormonal composition of media and types of pretreatments used in rooting stage in sour cherry 'Čačanski Rubin'

Oznaka tretmana za ožiljavanje <i>Designation of rooting treatment</i>	Tretman za ožiljavanje/Rooting treatment
R1	HF hranljiva podloga, 28 dana/HF medium, 28 days
R2	R1 + 1,0 mg l ⁻¹ IBA + 0,1 mg l ⁻¹ GA ₃ , 28 dana/R1 + 1.0 mg l ⁻¹ IBA + 0.1 mg l ⁻¹ GA ₃ , 28 days
R3	R1 + 1,0 mg l ⁻¹ NAA + 0,1 mg l ⁻¹ GA ₃ , 28 dana/R1 + 1.0 mg l ⁻¹ NAA + 0.1 mg l ⁻¹ GA ₃ , 28 days
R4	7 dana R2, 21 dan R1/7 days R2, 21 days R1
R5	7 dana R3, 21 dan R1/7 days R3, 21 days R1
R6	Bazalni deo izdanaka tretiran 1 min sa NAA (500 mg l ⁻¹), 28 dana R1/ 1-min dip treatment in NAA (500 mg l ⁻¹), 28 days R1

HF – Murashige i Skoog (1964) (MS) hranljiva podloga bez hormona sa mineralnim solima smanjenim na ½ i nepromenjenim organskim kompleksom/Hormon free Murashige and Skoog (1964) (MS) medium with mineral salts reduced to ½-strength and organic complex unchanged

Uslovi u kulturi in vitro. Kulture su gajene u klimatizovanoj prostoriji sa kontrolisanom temperaturom (23 ± 1 °C), fotoperiodom (16/8 h, svetlost/mrak) i intenzitetom svetlosti od $8,83 \text{ W m}^{-2}$, obezbeđenim sa belim fluorescentnim lampama, jačine 40 W, 6.500 K.

Statistička obrada podataka. Dobijeni rezultati za sve ispitivane parametre multiplikacije, ožiljavanja i aklimatizacije su obrađeni statistički, Analizom varijanse (ANOVA) i Dankanovim testom višestrukih intervala, za $p < 0,05$.

Rezultati i diskusija

Uspešno uspostavljanje aseptične kulture je jedan od prvih kritičnih koraka u *in vitro* razmnožavanju biljaka. Efikasnost ovog koraka je determinisana velikim brojem parametara, a među njima ključnu ulogu imaju vreme (sezona) i način uzimanja početnih eksplantata, vrsta eksplantata, veličina i kvalitet cele donor biljke, veština manipulacije, procedura površinske sterilizacije eksplantata, vrsta i koncentracija biljnih regulatora rastenja u hranljivim podlogama koje se koriste za inicijaciju rozete, uslovi gajenja početnih eksplantata i slično (Hartman & Kester, 1983). Prema literaturnim podacima, u mikropropagaciji drvenastih vrsta se koriste najviše 2–3 osnovna načina površinske sterilizacije, a najčešće korišćena među njima je procedura koja se bazira na upotrebi 70% etanola i 1–3% kalcijum ili natrijum-hipohlorita. Upotrebljena procedura površinske sterilizacije (70% etanol i 10% varikina kao izvor aktivnog hlora) u ovom radu nije dala zadovoljavajuće rezultate u odnosu na procenat kontaminiranih kultura. Uočena je jaka bakterijska i gljivična infekcija, tako da je procenat zaraženih kultura bio visok i iznosio 53,9%. Međutim, u odnosu na procenat nekrotiranih eksplantata (3,4%) procedura površinske sterilizacije je dala zadovoljavajući stepen preživljavanja kultura tako da je 42,7% eksplantata iniciralo rozetu (Sl. 1a).

Posle uspostavljanja aseptične kulture izdanci sorte Čačanski rubin su u prvih pet supkultura multiplirani na hranljivoj podlozi konstantnog sadržaja biljnih regulatora rastenja. Na osnovu rezultata praćenja promene regenerativne sposobnosti izdanaka u 5 uzastopnih supkultura utvrđeno je da se supkultivisanjem smanjila regenerativna sposobnost prikazana

kroz indeks multiplikacije u odnosu na prvu supkulturu (Tab. 3). Najveći indeks multiplikacije (3,11) je zabeležen u prvoj supkulturi, posle čega dolazi do značajnog smanjenja regenerativne sposobnosti. U intervalu od druge do pete supkulture izmereni indeks multiplikacije je u malom stepenu varirao, ali te promene nisu bile značajne. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja sprovedenim kod vegetativnih podloga trešnju i višnju (Gisela 5 i Gisela 6), šljivu (Fereley Jaspi) i krušku (Pyrodwarf) (Vujović *et al.*, 2007; Vujović *et al.*, 2012). Gubitak regenerativnog kapaciteta u prve 4 supkulture za čak 50% je uočen i kod ananasa (Hamad & Taha, 2008). Prema navedenim autorima uočeno smanjenje indeksa multiplikacije je prevashodno determinisano dužinom supkulture i može se prevazići produženjem vremena trajanja jedne supkulture sa 30 na 75 dana, čime se omogućava formiranje većeg broja začetaka aksilarnih pupoljaka koji će u sledećoj supkulturi dati multiplikaciju.

Norton & Norton (1986) su ispitujući uticaj supkultivisanja na multiplikaciju kod 6 ukrasnih vrsta i sorata familije *Rosaceae* utvrdili da posle nekoliko prvih supkultura (4–5 supkultura), tokom kojih je zabeležen rast, dolazi do postepenog smanjenja indeksa multiplikacije, ali i dužine izdanaka i veličine listova i to nezavisno od koncentracije BAP u hranljivoj podlozi za multiplikaciju. Prema ovim autorima uočeno postepeno smanjenje indeksa multiplikacije može biti rezultat epigenetičkih promena koje nastaju kao odgovor na permanentno prisustvo i kumulativno nakupljanje biljnih regulatora rastenja (najverovatnije citokinina), kao i inhibitornog efekta rezidua koje nastaju njihovim metabolizmom, ili smanjene dostupnosti nekih mineralnih komponenata i saharoze u hranljivoj podlozi za multiplikaciju. Mogući uzrok ove pojave je i nedostatak varijabilnosti faktora spoljašnje sredine u *in vitro* uslovima (fotoperiod, temperatura), koji bi imitirali sezonske promene *in vivo* (Norton & Norton, 1986). Smanjenje indeksa multiplikacije tokom supkultivisanja u našem eksperimentu je, međutim, bilo praćeno povećanjem rastenja izdanaka, posebno osovinskog. Tako je najveća prosečna dužina osovinskog izdanka utvrđena u petoj supkulturi, ali je to povećanje bilo značajno samo u odnosu na prvu supkulturu. Ovi rezultati potvrđuju rezultate drugih autora (Ružić, 1989; Pruski *et al.*, 2005; Durković, 2006; Ružić & Vujović, 2007) koji su uočili sličnu pojavu disbalansa između multipliranja i rastenja izdanaka *in vitro*.

Tab. 3. Parametri multiplikacije sorte višnje Čačanski rubin u uzastopnim supkulturama na MS hranljivoj podlozi sa 0,5 mg l⁻¹ BAP, 0,1 mg l⁻¹ IBA i 0,1 mg l⁻¹ GA₃*Multiplication parameters of sour cherry 'Čačanski Rubin' in five successive subcultures after initiation on MS medium with 0,5 mg l⁻¹ BAP, 0,1 mg l⁻¹ IBA and 0,1 mg l⁻¹ GA₃*

Supkultura <i>Subculture</i>	Indeks multiplikacije <i>Multiplication index</i>	Dužina osovinskog izdanka <i>Length of axial shoot (cm)</i>	Dužina bočnih izdanaka <i>Length of lateral shoots (cm)</i>
I	3,11 a ¹	0,85 b	0,58 b
II	2,30 b	1,12 a	0,76 a
III	2,03 b	1,16 a	0,68 ab
IV	2,19 b	1,11 a	0,58 b
V	2,11 b	1,22 a	0,63 b

¹Prosečne vrednosti za ispitivane parametre multiplikacije u istoj koloni koje su obeležene različitim slovima su statistički značajno različite (Duncan-ov test za $p < 0,05$)/*Mean values of multiplication parameters within each column followed by the different letter are significantly different according Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)*

Smanjenje regenerativne sposobnosti izdanaka tokom supkultivisanja je ukazalo na potrebu promene vrste i koncentracije biljnih regulatora rasteanja u hranljivoj podlozi. Ispitivanje uticaja vrste i koncentracije biljnih regulatora rasteanja na parametre multiplikacije kod ovog genotipa je pokazalo da je vrsta upotrebljenog auksina (IBA ili NAA) značajano uticala na indeks multiplikacije na hranljivim podlogama koji su sadržavale 1 mg l⁻¹ BAP, dok kod hranljivih podloga sa 0,5 mg l⁻¹ BAP, iako postoje razlike u indeksu multiplikacije izdanaka, one nisu statistički značajne (Tab. 4a). Najveći indeks multiplikacije (2,61) je kod ovog genotipa postignut na hranljivoj podlozi koja je sadržavala 1 mg l⁻¹ BAP u kombinaciji sa po 0,1 mg l⁻¹ NAA i GA₃, što je statistički značajno u odnosu na sve ostale ispitivane kombinacije biljnih regulatora rasteanja. Ovaj sastav hranljive podloge se takođe pokazao

kao najbolji u fazi multiplikacije sorte višnje Schattenmorelle (Borkowska, 1985). Međutim, vrlo važna odlika faze multiplikacije je izgled i kvalitet izdanaka za dalje supkultivisanje, koji je kod sorte Čačanski rubin bio prevashodno determinisan koncentracijom BAP u hranljivoj podlozi za multiplikaciju. Kod ovog genotipa je na hranljivoj podlozi sa 1 mg l⁻¹ BAP uočeno značajno smanjenje dužine izdanaka, kao i pojava vitifikacije naročito donjih listova u kontaktu sa hranljivom podlogom, a izdanci su imali izrazito uske, svetlo zelene listove i veliku količinu kalusa u osnovi (Tab. 4a, Sl. 1b). Međutim, izdanci gajeni na hranljivoj podlozi sa 0,5 mg l⁻¹ BAP u kombinaciji sa 0,1 mg l⁻¹ IBA i GA₃, iako su imali niži indeks multiplikacije, odlikovali su se dugim stablom, dobro razvijenim habitusom i širokim, tamno zelenim listovima bez znakova hloroz, ili hiperhidričnosti tako da su bili veoma pogodni

Tab. 4a. Parametri multiplikacije sorte višnje Čačanski rubin na MS hranljivoj podlozi obogaćenoj različitim regulatorima rasteanja u 5. supkulturi

Multiplication parameters of sour cherry 'Čačanski Rubin' on MS medium containing different plant growth regulators in fifth subculture

Oznaka hranljive podloge za multiplikaciju <i>Designation of medium for multiplication</i>	Indeks multiplikacije <i>Multiplication index</i>	Dužina osovinskog izdanka <i>Length of axial shoot (cm)</i>	Dužina bočnih izdanaka <i>Length of lateral shoots (cm)</i>	Broj listova osovinskog izdanka <i>No of leaves of axial shoot</i>	Broj listova bočnih izdanaka <i>No of leaves of lateral shoots</i>
M1	2,11 b ¹	1,22 a	0,63 a	12,9 b	5,4 b
M2	1,83 b	1,23 a	0,63 a	16,4 a	5,9 a
M3	1,34 c	1,09 b	0,52 b	16,1 a	4,8 c
M4	2,61 a	1,10 b	0,57 ab	12,2 b	6,0 a

¹Prosečne vrednosti za ispitivane parametre multiplikacije u istoj koloni koje su obeležene različitim slovima su statistički značajno različite (Duncan-ov test za $p < 0,05$)/*Mean values of multiplication parameters within each column followed by the different letter are significantly different according Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)*

za dalje gajenje (Tab. 4a, Sl. 1c). Ova kombinacija biljnih regulatora rastenja se, sa stanovišta kvaliteta izdanaka, pokazala kao najpogodnija za multiplikaciju i sorte višnje Šumadinka uprkos činjenici da je zabeležen niži indeks multiplikacije u odnosu na druge testirane kombinacije biljnih regulatora rastenja (Cerović & Ružić, 1987). Značajan uticaj koncentracije BAP na dužinu izdanaka nezavisno od prisustva auksina u hranljivim podlogama za multiplikaciju je utvrđen i kod divlje trešnje (*P. avium* L.) (Durković, 2006). Takođe, smanjenje dužine izdanaka kao i pojava uvijenih listova male površine sa povećanjem koncentracije BAP je uočena i kod drugih predstavnika roda *Prunus*, kao što su podloga za trešnju Maxma-14 (Muna et al., 1999), ili *P. virginiana* i *P. pensylvanica* (Pruski et al., 2000).

Vrsta upotrebljenog auksina je imala značajan uticaj na svežu i suhu masu kalusa samo pri nižoj koncentraciji BAP (Tab. 4b). Najmanje vrednosti ovih parametara su dobijene na hranljivoj podlozi sa 0,5 mg l⁻¹ BAP u kombinaciji sa IBA, a najveće u kombinaciji sa NAA. Međutim, sveža masa osovinskog izdanka je imala najveću vrednost na hranljivoj podlozi koja je sadržavala 1 mg l⁻¹ BAP u kombinaciji sa IBA, što je bilo statistički značajno u odnosu na sve ostale kombinacije. Na ovoj hranljivoj podlozi je ustanovljena i najveća prosečna vrednost za suhu masu osovinskog izdanka. Izdanci su bili krupni, sa kratkim, snažnim stablom i velikim brojem širokih tamnozelenih listova, ali su se kod 50% izdanaka uočavali listovi koji su savijeni ivicama na gore duž glavnog lisnog nerva, kao i pojava nekroze vrha lista.

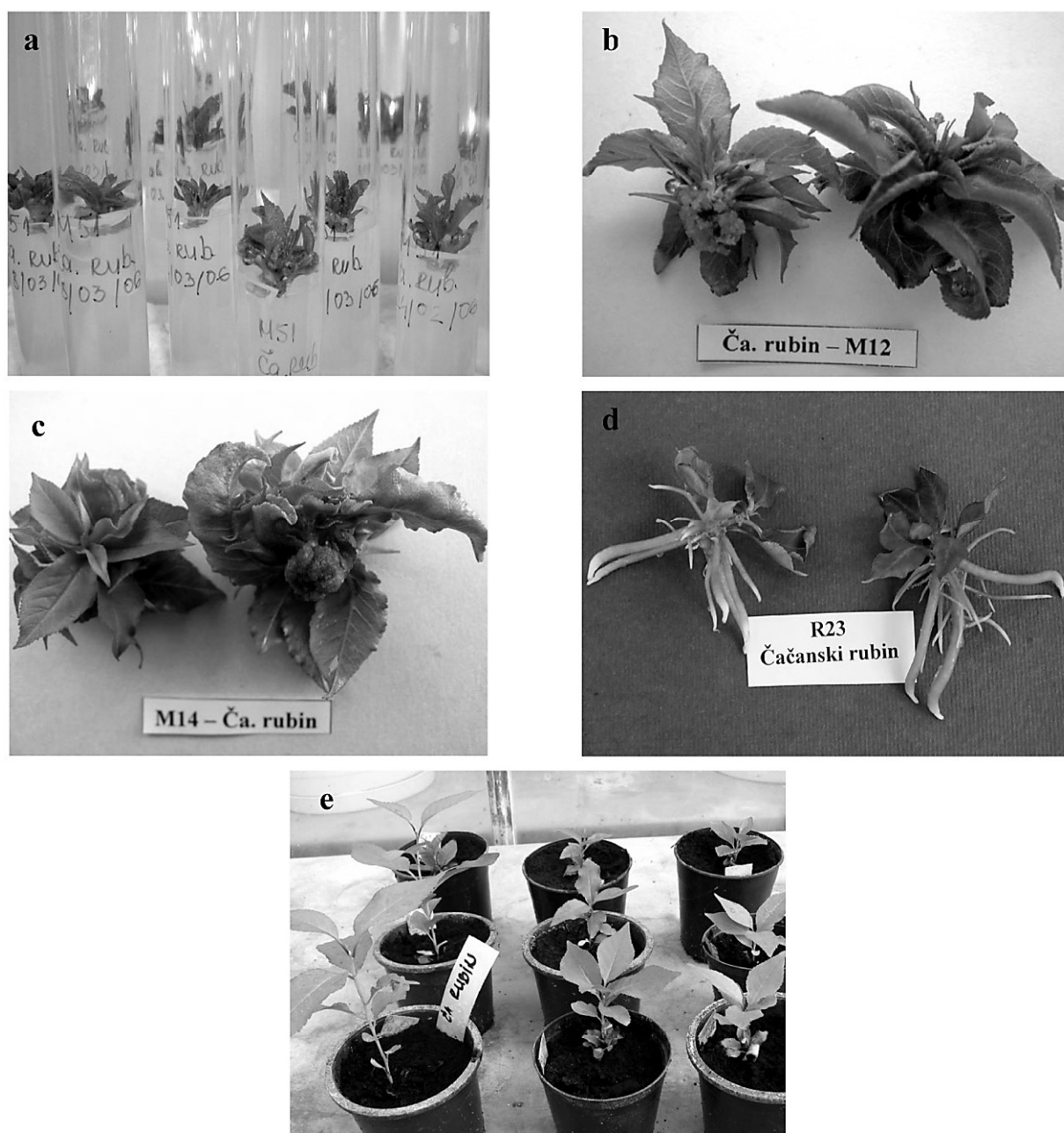
Kapacitet za ožiljavanje izdanaka *in vitro* zavisi od velikog broja faktora kao što su starost eksplantata odnosno dužina supkultivisanja (Grant & Hammat, 1999), koncentracija i vrsta citokinina, odnosno količina citokinina u tkivima usvojena tokom faze multiplikacije *in vitro*, kao i odnos koncentracije citokinin/auksin u hranljivoj podlozi za multiplikaciju (Muna et al., 1999). Poznato je da ožiljavanje *in vitro* može biti značajno otežano zbog produženog dejstva citokinina usvojenih tokom faze multiplikacije. Kod mnogih rodova i vrsta ožiljavanje je moguće postići samo uklanjanjem citokinina iz hranljive podloge, odnosno korišćenjem hranljivih podloga bez hormona (Arrillaga et al., 1991). Međutim, kod drvenastih vrsta ovakav pristup je manje efikasan i za uspešno ožiljavanje je neophodno prisustvo auksina. To je dokazano i u ovom eksperimentu gde je na HF hranljivoj podlozi dobijen izuzetno nizak procenat i loš kvalitet ožiljenih biljaka (Tab. 5). Sorta višnje Čačanski rubin je u našem eksperimentu pokazala nizak kapacitet za ožiljavanje i na hranljivoj podlozi sa 1 mg l⁻¹ IBA koji je najčešće korišćen auksin za ožiljavanje biljaka roda *Prunus*, dok na hranljivoj podlozi sa istom koncentracijom NAA nije uočeno ožiljavanje. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su Cerović & Ružić (1987) dobili kod sorte višnje Šumadinka. Tretmani koji su uključivali 7 dana gajenja na hranljivoj podlozi sa IBA ili NAA, pa 21 dan na HF hranljivoj podlozi takođe nisu doveli do povećanja procenta ožiljavanja. Iako je u većini slučajeva permanentno prisustvo auksina u hranljivoj podlozi neophodno za uspešno ožiljavanje, nekada kratko izlaganje visokim koncen-

Tab. 4 b. Sveža i suva masa kalusa i izdanaka sorte višnje Čačanski rubin na MS hranljivoj podlozi obogaćenoj različitim regulatorima rastenja u 5. supkulturi

Fresh and dry weight of shoots of sour cherry 'Čačanski Rubin' on MS medium containing different plant growth regulators in fifth subculture

Oznaka hranljive podloge za multiplikaciju <i>Designation of medium for multiplication</i>	Sveža masa izdanaka/ <i>Fresh weight of shoots (mg)</i>			Suva masa izdanaka/ <i>Dry weight of shoots (mg)</i>		
	Kalus <i>Callus</i>	Osovinski izdanak <i>Axial shoot</i>	Bočni izdanak <i>Lateral shoots</i>	Kalus <i>Callus</i>	Osovinski izdanak <i>Axial shoot</i>	Bočni izdanak <i>Lateral shoots</i>
M1	84,3 c ¹	231,6 b	38,7 b	11,3 c	39,9 ab	5,5 c
M2	119,9 a	261,6 b	46,4 ab	15,0 a	43,5 a	6,6 ab
M3	111,0 ab	313,5 a	42,8 b	13,2 b	44,5 a	5,8 bc
M4	102,3 b	230,6 b	52,8 a	12,6 b	37,2 b	6,7 a

¹Prosečne vrednosti za ispitivane parametre u istoj koloni koje su obeležene različitim slovima su statistički značajno različite (Duncan-ov test za $p < 0,05$)/*Mean values of parameters within each column followed by the different letter are significantly different according Duncan's Multiple Range Test (P < 0.05)*



Sl. 1. Izdanci sorte višnje Čačanski rubin u različitim fazama mikropropagacije: a) uspostavljanje aseptične kulture – indukcija rozete; b) multiplikacija na MS hranljivoj podlozi sa BAP 1,0, NAA 0,1 i GA_3 0,1 $mg\ l^{-1}$; c) multiplikacija na MS hranljivoj podlozi sa BAP 0,5, IBA 0,1 i GA_3 0,1 $mg\ l^{-1}$; d) ožiljavanje na HF hranljivoj podlozi posle pretretmana bazalnog dela izdanaka rastvorom NAA (500 $mg\ l^{-1}$); e) aklimatizacija pod „mist” sitemom u staklari

Shoots of sour cherry 'Čačanski Rubin' in different stages of micropropagation: a) establishment of aseptic culture – rosette initiation; b) multiplication on MS medium containing BAP 1.0, NAA 0.1 and GA_3 0.1 $mg\ l^{-1}$; c) multiplication on MS medium containing BAP 0.5, IBA 0.1 and GA_3 0.1 $mg\ l^{-1}$; d) rooting on HF medium after 1-min dip pretreatment with NAA (500 $mg\ l^{-1}$); e) acclimatization under the 'mist' system in green house

Tab. 5. Parametri ožiljavanja sorte višnje Čačanski rubin
Rooting parameters of sour cherry 'Čačanski Rubin'

Oznaka tretmana za ožiljavanje <i>Designation of rooting treatment</i>	% ožiljavanja <i>% of rooting</i>	Broj korenova <i>No. of roots</i>	Dužina korenova <i>Root length (cm)</i>	Dužina izanaka <i>Height of shoots (cm)</i>
R1	10,0 c ¹	1,5 b	0,70 c	1,80 a
R2	25,0 b	1,6 b	5,02 a	0,80 b
R3	–	–	–	–
R4	10,0 c	3,5 b	2,59 b	1,40 ab
R5	–	–	–	–
R6	60,0 a	6,3 a	1,45 bc	0,82 b

¹Prosečne vrednosti za ispitivane parametre ožiljavanja u istoj koloni koje su obeležene različitim slovima su statistički značajno različite (Duncan-ov test za $p < 0,05$) / *Mean values of rooting parameters within each column followed by the different letter are significantly different according Duncan's Multiple Range Test ($P < 0,05$)*

tracijama auksina koje je praćeno gajenjem izdanaka na HF hranljivoj podlozi može takođe biti efikasno u indukciji rizogeneze, kao što je uočeno kod podloge Damil GM 61/1 (Ružić *et al.*, 2007), kao i kod podloge Maxma 14 (Hepaskoy, 2004). Značajno povećanje procenta ožiljavanja i prosečnog broja korenova po ožiljenoj biljci uočeno je i kod sorte Čačanski rubin gajene na HF hranljivoj podlozi uz pretretman uranjanja bazalnog dela izdanaka u rastvor NAA (500 mg l⁻¹) (Tab. 5). Međutim, kod ovog tretmana izdanci sorte Čačanski rubin su bili bez porasta, sa jako kratkim stablom i uočavala se pojava hloroze ivica i nekroze vrha listova (Sl. 1d).

Tokom procesa aklimatizacije biljke moraju da se adaptiraju na nove uslove sredine kao što su niža relativna vlažnost, veći intenzitet svetlosti, variranje temperature spoljašne sredine, kao i konstantan infektivni pritisak zbog nesterilnih uslova *ex vitro* sredine. Jedan od bitnih preduslova za opstanak biljaka razmnoženih *in vitro* je i dobro formiran korenov sistem koji će obezbediti adekvatnu ishranu biljke do početka *ex vitro* rastanja i pojave novih listova. Prema nekim podacima *ex vitro* ožiljavanje i simultana aklimatizacija mogu značajno sniziti troškove proizvodnje biljaka razmnoženih mikropropagacijom *in vitro* (Maene & Debergh, 1983). Iako nekada procenti aklimatizacije ožiljenih i neožiljenih izdanaka *in vitro* vrlo malo variraju, kao što je uočeno kod sorte trešnje Kristiina (Vasar, 2004), najčešće su gubici biljaka tokom aklimatizacije toliko veliki da ne opravdavaju primenu *ex vitro* ožiljavanja (Hazarika, 2006). Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima takođe potvrđuju da je procenat

aklimatizacije značajno veći kod ožiljenih (55,6%) u odnosu na neožiljene izdanke (14,8%), iako im je prethodila indukcija rizogeneze. Međutim i postignuti procenat aklimatizacije ožiljenih izdanaka takođe predstavlja relativno nisku vrednost za uspešnu aklimatizaciju (Sl. 1e). Nizak procenat preživljavanja biljaka ožiljenih *in vitro* tokom aklimatizacije je uočen i kod drugih predstavnika roda *Prunus* kao što su sorte šljive Čačanska rodna i Valjevka (Ružić & Vujović, 2007), sorta kajsije Bebecou (Koubouris & Vasilakakis, 2006). Propadanje ožiljenih izdanaka po iznošenju u *ex vitro* uslove je verovatno posledica pojave da se u većini slučajeva rizogeneza dešavala indirektno iz kalusa, a ne direktno iz osnove izdanaka, tako da su izostajale vaskularne veze između izdanaka i ovako formiranih korenova, što smanjuje procenat aklimatizacije (Bommineni *et al.*, 2001).

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se dati sledeći zaključci:

– Sorta višnje Čačanski rubin je uspešno uvedena u kulturu *in vitro*, a upotrebljena procedura površinske sterilizacije eksplantata je dala zadovoljavajuće rezultate u odnosu na procenat nekrotiranih pupoljaka koji je bio izuzetno mali i iznosio svega 3,4%. Međutim, visok procenat kontaminiranih pupoljaka (53,9%), ukazuje na potrebu dalje optimizacije ove faze, produžavanjem vremena i/ili promenom načina površinske sterilizacije;

– Uočeno smanjenje regenerativne sposobnosti tokom supkultivisanja ukazuje na potrebu promene vrste i koncentracije biljnih regulatora rasteanja u hranljivoj podlozi, ali i drugih faktora tokom faze multiplikacije *in vitro*;

– Relativno niske vrednosti procenata ožiljavanja i aklimatizacije kod ovog genotipa mogu biti prevaziđene usavršavanjem faze ožiljavanja u cilju poboljšanja kvaliteta ožiljenih biljaka i indukcije direktne rizogeneze iz osnove *in vitro* izdanaka bez prelazne kalusne forme;

– Na osnovu praćenja procenata aklimatizacije ožiljenih i neožiljenih izdanaka ne može se preporučiti direktna sadnja neožiljenih izdanaka u zemljišni supstrat u cilju ubrzanja procesa mikropropagacije i smanjenja troškova proizvodnje biljaka razmnoženih *in vitro*.

Dobijeni rezultati pokazuju da prikazani protokol za razmnožavanje višnje sorte Čačanski rubin, uz neznatna usavršavanja faze multiplikacije i ožiljavanja, uvođenjem novih regulatora rasteanja i/ili variranjem njihove koncentracije, može naći širu primenu u komercijalnim *in vitro* laboratorijama.

Zahvalnica/Acknowledgements

Ova istraživanja su finansijski podržana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS (projekti TR-20013A i TR-31064).

Literatura

- Arrillaga I., Marzo T., Segura J. (1991): Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 341–348.
- Bommineni V.R., Mathews H., Samuel S.B., Kramer M., Wagner D.R. (2001): A new method for rapid *in vitro* propagation of apple and pear. *HortScience*, 36, 6: 1102–1106.
- Borkowska B. (1985): Micropropagation of sour cherry, cultivar Schattenmorelle. *Acta Horticulturae*, 169: 329–334.
- Buyukdemirci H. (2008): The effects of medium ingredients on shoot propagation and rooting of cherry rootstocks *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 795: 419–422.
- Cerović R., Ružić Đ. (1987): Micropropagation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cv. Šumadinka. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 9: 151–157.
- Durković J. (2006): Rapid micropropagation of mature wild cherry. *Biologia Plantarum*, 50, 4: 733–736.
- Dziedzic E., Malodobry M. (2006): Vegetative cherry rootstock in tissue culture. *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture*, 25, 3: 77–84.
- Grant N.J., Hammat N. (1999): Increased root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: effect of subculture frequency. *Tree Physiology*, 19: 899–903.
- Hamad A.M., Taha R.M. (2008): Effect of sequential subcultures on *in vitro* proliferation capacity and shoot formation pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. *Scientia Horticulturae*, 117: 329–334.
- Hartman H.T., Kester D.E. (1983): *Plant propagation, principles and practices*. Prentice-Hall INC, Engelwood Cliffs, New Jersey, USA, pp. 545–552.
- Hazarika B.N. (2006): Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108: 105–120.
- Hepaksoy S. (2004): *In vitro* propagation of Maxma 14 sweet cherry rootstock. *Journal of Aegean Agricultural Research Institute*, 14, 2: 67–80.
- Koubouris G., Vasilakakis M. (2006): Improvement of *in vitro* propagation of apricot cultivar Bebecou. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85: 173–180.
- Maene L.M., Debergh P.C (1983): Rooting of tissue cultured plants under *in vivo* conditions. *Acta Horticulturae*, 131: 201–208.
- Muna A.S., Ahmad A.K., Mahmoud K., Abdul-Rahman K. (1999): *In vitro* propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59, 3: 203–208.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
- Norton M.E., Norton C.R. (1986): Change in shoot proliferation with repeated *in vitro* subculture of shoots of woody species of *Rosaceae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, 3: 187–197.
- Pruski K.W., Lewis T., Astatkie T., Nowak J. (2000): Micropropagation of chokencherry and pincherry cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 93–100.
- Pruski K., Astatkie T., Nowak J. (2005): Tissue culture of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) i Nanking cherry (*Prunus tomentosa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82: 207–211.
- Ružić Đ. (1989): Uporedno proučavanje primene sintetičkih i prirodnih biljnih bioregulatora u razmnožavanju višnje cv Šumadinka (*Prunus cerasus* L.) metodom kulture tkiva. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, pp. 1–94.
- Ružić Đ. (1998): Reakcija genotipova nekih vrsta roda *Prunus* u kulturi *in vitro* na mineralni sastav podloge. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, pp. 1–154.
- Ružić Đ., Cerović R. (2003): Primena *in vitro* metoda kod koštičavih vrsta voćaka. *Jugoslovensko voćarstvo*, 37, 141/142: 37–49.
- Ružić Đ., Vujović T. (2007): Protokol za brzo razmnožavanje šljive (*Prunus domestica* L.) mikropropagacijom *in vitro*. *Voćarstvo*, 41, 157/158: 79–85.
- Ružić Đ., Vujović T. (2008): The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv Lapins (*Prunus cerasus* L.). *Horticultural Science*, 35, 1: 12–21.

- Ružić Đ., Stikić R., Todić S., Veličković M. (2009): Primena savremenih teorijskih saznanja u oblasti fiziologije i ekologije voćaka i vinove loze. *Voćarstvo*, 43, 167/168: 65–79.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R., Radičević S. (2007): Slabo bujna podloga za trešnju i višnju Damil GM 61/1 – mogućnost brzog razmnožavanja i uvođenja u kulturu. *Zbornik naučnih radova XXII savetovanja o unapređenju proizvodnje voća i grožđa*, Grocka, 13, 5: 47–55.
- Sedlak J., Paprštein F. (2008): *In vitro* shoot proliferation of sweet cherry cultivars Karešova and Rivan. *Horticultural Science (Prague)*, 35, 3: 95–98.
- Sedlak J., Paprštein F., Erbenova M. (2008): *In vitro* propagation of the P-HI dwarfing sweet cherry rootstocks. *Acta Horticulturae*, 795: 395–400.
- Tantos A., Meszaros A., Farkas T., Szalai J., Horvath G. (2001): Triacantanol-supported micropropagation of woody plants. *Plant Cell Reports*, 20: 16–21.
- Vasar V. (2004): Application of antioxidants in rooting of *Prunus avium* L. microshoots. *Acta Universitatis Latvinensis Biology*, 676: 251–256.
- Vujović T., Ružić Đ., Milenković S. (2007): Uvođenje nove podloge za šljivu, Fereley Jaspi, u proizvodnju sertifikiranog sadnog materijala metodom mikropropagacije *in vitro*. *Voćarstvo*, 41, 157/158: 71–77.
- Vujović T., Ružić Dj., Cerović R. (2012): *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. *Horticultural Science (Prague)*, 39, 3: 101–107.

MICROPROPAGATION OF SOUR CHERRY 'ČAČANSKI RUBIN' (*PRUNUS CERASUS* L.)Tatjana Vujović¹, Đurđina Ružić¹, Radosav Cerović²¹Fruit Research Institute, Kralja Petra II/9, 32000 Čačak, Serbia

E-mail: tatjanal@ftn.kg.ac.rs

²Innovation Center, Faculty of Technology and Metallurgy, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Serbia**Abstract**

The paper describes the protocol for micropropagation of sour cherry 'Čačanski Rubin' (*Prunus cerasus* L.) bred at the Fruit Research Institute in Čačak. Aiming at developing efficient protocol for micropropagation of this genotype, the influence of repeated subculturing on proliferation capacity of *in vitro* shoots as well as the effect of change of type and concentration of plant growth regulators on multiplication and rooting phases were studied.

With standard method of surface sterilization of initial explants, aseptic culture was established and leaf rosettes were initiated on Murashige and Skoog (1962) medium (MS) with 2.0 mg l⁻¹ BAP, 0.5 mg l⁻¹ IBA and 0.1 mg l⁻¹ GA₃. After establishment of aseptic culture, regenerated shoots were multiplied in five successive subcultures on MS medium supplemented with 0.5 mg l⁻¹ BAP in combination with IBA and GA₃ each applied at 0.1 mg l⁻¹. The following multiplication parameters were monitored: multiplication index, length of axial and lateral shoots. With aim to optimize multiplication stage and determine the optimal hormonal composition of multiplication medium, the influence of increase in BAP concentration and/or type of auxins (IBA or NAA), on multiplication index, fresh and dry weight of shoots was examined in fifth subculture after initiation. During multiplication on MS medium with constant hormonal composition, the decline in shoot formation capacity over repeated subcultures was observed, so as the highest value of mul-

tiplication index (3.11) was noticed in first subculture after initiation. However the subculturing improved the shoot elongation, and the highest value of shoots length, especially in axial shoots (1.22 cm), was observed in fifth subculture. Although increase in BAP concentration from 0.5 to 1.0 mg l⁻¹ in combination with NAA instead of IBA in fifth subculture increased multiplication index, the shoots multiplied on this medium were not suitable for further growing due to the significant decrease in shoot length as well as to the appearance of hyperhydricity.

Sour cherry 'Čačanski Rubin' displayed very low rooting ability on HF medium as well as on medium with 1.0 mg l⁻¹ IBA which is the most common medium used for rooting of different species of *Prunus* genus, while on medium containing NAA at same concentration rhizogenesis was not observed. The highest rooting rate (60.0%) as well as the highest number of roots per shoot (6.3) in this genotype were achieved with 1-min dip treatment in NAA dissolved in sterile water (500 mg l⁻¹) followed by growing on HF medium.

The percentage of acclimatization under the 'mist' system in green house was significantly higher for shoots rooted *in vitro* (55.6%) than for unrooted shoots (14.8%).

Key words: sour cherry, aseptic culture, multiplication, rooting, acclimatization