

Uticaj vrste i koncentracije citokinina na *in vitro* multiplikaciju podloge za trešnju Gisela 5

Đurđina Ružić¹, Tatjana Vujović¹, Radosav Cerović², Dragana Vranić¹

¹Institut za voćarstvo, Kralja Petra I/9, 32000 Čačak, Srbija
Email: djinaruzic@gmail.com

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

Primljeno: 06. marta 2014; prihvaćeno: 08. oktobra 2014.

Rezime. Za uspešnu mikropropagaciju, između drugih *in vitro* faktora, veoma je važna upotreba optimalnih tipova i koncentracija biljnih regulatora rastanja. Sa ciljem da se optimalizuje *in vitro* multiplikacija podloge za trešnju Gisela 5, proučavan je uticaj različitih citokinina: benzil adenin (BA), izopentenil adenin (2iP), kinetin (KIN) i tidiazuron (TDZ) u koncentraciji od 0,2, 0,4, 1, 2 i 3 mg l⁻¹ samostalno i u kombinaciji sa auksinom indol-3-buterna kiselina (IBA) u koncentraciji od 0,1, 0,5 i 1 mg l⁻¹. U svim kombinacijama korišćen je kao osnovni medijum Murashige & Skoog (1962). Praćeni su sledeći parametri multiplikacije: indeks multiplikacije, dužina osovinskog i lateralnih izdanaka, kao i sveža i suva masa kalusa i izdanaka (izdanak – stablo sa listovima). Praćene su takođe i neke specifične pojave kao što su boja, veličina listova i kalusa, pojava hloroze, nekroze i rizogeneze u fazi multiplikacije. Najveći indeks multiplikacije dobijen je na medijumu sa 2 i 3 mg l⁻¹ BA, a dužina osovinskog i lateralnih izdanaka na medijumu 0,4 mg l⁻¹ BA. Generalno, vrlo slaba multiplikacija je dobijena na medijumima sa 2iP, KIN i TDZ, dok je u mnogim kombinacijama sa 2iP i KIN, a posebno sa KIN indukovana rizogeneza. Dobijeni rezultati ukazuju da je izbor citokinina za fazu multiplikacije (u odnosu na sve praćene parametre) podloge za trešnju Gisela 5 ograničen na upotrebu BA. Međutim, za brzu mikropropagaciju sjeđinjavanjem faze ožiljavanja i multiplikacije može se koristiti i KIN. Za dobijanje snažnih izdanaka (u fazi izduživanja koja prethodi fazi ožiljavanja) mogu se koristiti KIN i 2iP.

Ključne reči: citokinini, podloga za trešnju, *in vitro* multiplikacija, indukcija korenova

Uvod

Gisela 5 je inerspecijes hibrid nastao ukrštanjem između *Prunus cerasus* x *Prunus canescens* (No. 148/2), i jedna je od najuspešnijih i najviše raširenih slabobujnih podloga za trešnju (Ružić et al., 2000). Podloga Gisela 5 utiče na bočno grananje sa širokim uglovima, na ranu i visoku rodnost (Mihailović-Bošnjak et al., 2012), i reducira rast za 50% i više (Long, 2009).

Neki autori su proučavali mikropropagaciju ove podloge sa osvrtom na uticaj i usvajanje makroelemenata iz medijuma, kao što su Ružić et al. (2000), dok su Nacheva & Gercheva (2009) proučavali uticaj različitih koncentracija auksina i ugljenih hidrata na multiplikaciju podloge Gisela 5.

Danas je poznato više od 200 prirodnih i sintetičkih citokinina, a lista njihovih fizioloških efekata je već poznata. Mnogi su veoma efikasni u *in vitro* sistemima, iako zahtevaju različitih biljnih vrsta, u pogledu

tipa i optimalne koncentracije neophodne za uspešno *in vitro* rastenje i multiplikaciju, mogu biti značajno različiti (Huetteman & Preece, 1993). Poznato je da citokinini utiču na ćelijsku deobu i ekspanziju ćelija u kulturi biljnog tkiva i mnoga proučavanja su se upravo odnosila na tip i koncentraciju odgovarajućeg citokinina za svaku biljnu vrstu.

Citokinini se svrstavaju u dve velike grupe: sintetički derivati fenilurea, kao što je 1-phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)urea (thidiazuron; TDZ) i derivati adenina, među kojima ima prirodnih citokinina, kao što su kinetin (KIN) i benzil adenin (BA) (Kadota & Niimi, 2003). Benzil adenin se široko koristi u mikropropagaciji vrsta voćaka i dao/daje veoma dobre rezultate u kombinaciji sa različitim auksinima (Ružić & Vujović, 2008; Ružić *et al.*, 2000; Ružić *et al.*, 2001).

Tidiazuron je potentan biljni regulator rasteња pa se kod mnogih drvenastih biljnih vrsta uglavnom koristi u ekstremno niskim koncentracijama za stimulaciju proliferacije izdanaka aksilarnog porekla (Huetteman & Preece, 1993). Proučavanja uticaja TDZ su dostigla svoj maksimum 90-tih godina XX veka.

Međutim, citokinini isopentenil adenin (2iP) i kinetin (KIN) se ređe koriste za mikropropagaciju različitih vrsta voćaka (Ružić & Cerović, 1985; Jaakola *et al.*, 2001; Ostrolucká *et al.*, 2004; Ružić & Vujović, 2008).

S obzirom na važnost *in vitro* multiplikacije, cilj ovih istraživanja je da se razvije protokol za optimizaciju uslova ove faze upotrebom 4 vrste citokinina u različitim koncentracijama (BA, TDZ, 2iP i KIN), u kombinaciji sa auksinom IBA.

Materijal i metode

Biljni materijal. Aseptična kultura podloge za trešnju Gisela 5 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*), kao i multiplikacija izdanaka je urađena u Laboratoriji za kulturu tkiva (Odeljenje za fiziologiju voćaka) Instituta za voćarstvo, Čačak (Republika Srbija).

Pre postavljanja na odgovarajući hranljivi medijum, izdanci su supkultivisani na tim istim medijumima jedan pasaż, kako bi se izbegao efekat rezidua, tako da su morfometrijska merenja, kao i uzorci za svežu/suvu masu uzimani iz druge supkulture svakog medijuma.

Hranljivi medijumi/podloge. Regeneracioni hranljivi medijum za inicijaciju rozete je bio Murashige & Skoog (1962) (MS) sa u $mg\ l^{-1}$: benzil adenin (BA) 2, indol-3-buterna kiselina (IBA) 0,5 i giberelna kiselina (GA_3) 0,1. Posle uspostavljanja aseptične kulture izdanci su umnožavani na MS medijumu sa u $mg\ l^{-1}$: BA 1, IBA 0,1 i GA_3 0,1. Kada je umnožen dovoljan broj izdanaka za uspostavljanje ogleada, isti su postavljeni na MS medijum sa: BA, 2iP, KIN i TDZ u koncentracijama od 0,2, 0,4, 1, 2 i 3 $mg\ l^{-1}$, pojedinačno i u kombinaciji sa auksinom IBA u koncentracijama od 0,1, 0,5, i 1 $mg\ l^{-1}$. Osnovni rastvor („stock solution“) TDZ je pravljen rastvaranjem sa DMSO i sterilisanjem u autoklavu. Pre sterilizacije autoklaviranjem pH vrednost svih medijuma je podešavana na 5,75 sa 0,1 N KOH.

Svi medijumi su sterilisani u autoklavu 20 min. na 120 °C, a sadržavali su agar u koncentraciji od 7 $g\ l^{-1}$ i saharozu 20 $g\ l^{-1}$.

Parametri multiplikacije. Parametri multiplikacije su determinisani korišćenjem standardne morfometrije. Izdanci manji od 0,5 *cm* nisu uzimani u razmatranje.

Praćeni su sledeći parametri: indeks multiplikacije, dužina osovinskog i lateralnih izdanaka. Praćena je takođe sveža (FW) i suva masa (DW) kalusa, osovinških i lateralnih/bočnih izdanaka (stablo i listovi). Izdanci su po vađenju sa medijuma ispirani sterilnom vodom, osušeni sa filter papirom i onda je određivana sveža masa merenjem. Za određivanje suve mase, izdanci su sušeni u sušnici na 65–70 °C, 48 h.

Praćene su i neke specifične pojave, kao što je boja, veličina kalusa i listova, uvijenost listova, pojava hloroze ili nekroze i rizogeneze.

Uslovi gajenja biljaka. Kulture su gajene u klimatizovanoj prostoriji u uslovima fotoperioda 16 h svetlost/8 h mrak sa intenzitetom svetla od 41 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ na površini biljaka, što su obezbeđivale bele fluorescentne lampe od 40 W, 6,500 °K. Temperatura u prostoriji za gajenje je bila od 23 ± 1 °C.

Obrada podataka. Dobijene vrednosti su analizirane ANOVA i F-test-om, kao i pojedinačnim Dankanovim testom višestrukih intervala za $P < 0,05$. Ogled je postavljen sa 6 posuda za gajenje x 3 uniformna izdanka x 80 tretmana (20 medijuma/kombinacija x 4 citokinina) x 2 ponavljanja.

Rezultati

Uticaj dve grupe citokinina, sintetičkih derivata fenilurea i derivata adenina na fazu multiplikacije vegetativne podloge za trešnju Gisela 5 je proučavan u ovom radu.

Najveći indeks multiplikacije sa BA je dobijen korišćenjem koncentracije od 2 mg l^{-1} u kombinaciji sa $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA, a najveća dužina izdanaka sa $0,4 \text{ mg l}^{-1}$ BA (Tab. 1). Na medijumu sa 2 mg l^{-1} BA i $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA, na kome je dobijen najveći indeks multiplikacije izdanci su bili krupni, sa tamno zelenim listovima, i zelenim do smeđim kalusom, čvrste nodularne konzistencije (Sl. 1 a). Na drugim medijumima sa BA, izdanci su uglavnom bili krupni, što se odrazilo na FW i DW kalusa (1 mg l^{-1} BA i $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA) i izdanaka, posebno u koncentraciji od 3 mg l^{-1} BA (Graf. 1).

Na medijumima sa TDZ, indeks multiplikacije nije prelazio 1,56 (Tab. 2), ali su sveža i suva masa bile veće, posebno kalusa (Graf. 2). Na nekim medijumima

uopšte nije bilo multiplikacije (Tab. 2). Osnovne karakteristike izdanaka gajenih na ovim medijumima su: kratki i jaki izdanci, veliki, čvrsti listovi i nodularan kalus (Sl. 1 b). Na listovima su uočavani i sporadični znaci hloroze i nekroze, kao i formiranje kalusa u dođiru sa medijumom.

Osobine biljaka gajenih na medijumima sa 2iP su bile: veliki i široki listovi, jaki izdanci bez multiplikacije (Tab. 3), ali sa pojavom rizogeneze u osnovi izdanaka (Sl. 1 c). Procenat ožiljavanja se kretao do 16,7% na medijumu sa $0,4 \text{ mg l}^{-1}$ 2iP i 1 mg l^{-1} IBA (Tab. 3). Masa kalusa je imala linearan trend povećanja sa povećanjem koncentracije IBA (Graf. 3).

Na medijumima sa KIN izdanci su bili krupni sa velikim listovima i smeđim ili tamnosmeđim nodularnim, kompaktnim kalusom. Najveća FW nije dostizala onu dobijenu na medijumima sa BA, 2iP i TDZ (Graf. 4). Izdanci nisu multiplicirali, a dužina osovin-skog izdanka je bila najveća na medijumima sa najvišom koncentracijom KIN (3 mg l^{-1}) i IBA (1 mg l^{-1}) (Tab. 4).

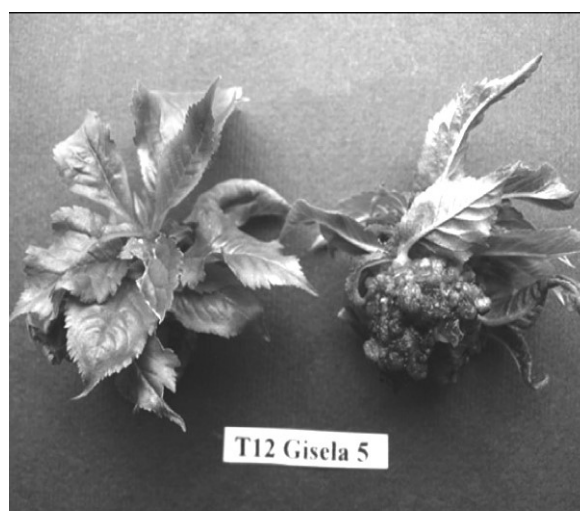
Tab. 1. Multiplikacija *in vitro* podloge za trešnju Gisela 5 na medijumima sa BA
Multiplication in vitro of sweet cherry rootstock Gisela 5 on media with BA

Oznaka medijuma <i>Mark of media</i>	BA (mg l^{-1})	IBA (mg l^{-1})	Indeks multiplikacije <i>Multiplication index</i>	Dužina osovin-skog izdanka <i>Length of axial shoot</i> (cm)	Dužina bočnih izdanaka <i>Length of lateral shoots</i> (cm)
B1	0,2	0	2,17 bc*	1,68 def	0,66 cde
B2	0,2	0,1	1,61 efg	1,94 abc	0,61 cde
B3	0,2	0,5	1,28 fgh	1,63 efg	0,70 bcd
B4	0,2	1,0	1,28 fgh	1,57 efg	0,74 bc
B5	0,4	0	1,89 cde	2,15 a	1,11 a
B6	0,4	0,1	1,44 fgh	1,88 bcd	1,22 a
B7	0,4	0,5	2,17 bc	2,07 ab	1,11 a
B8	0,4	1,0	2,00 cd	1,95 abc	1,09 a
B9	1	0	1,11 h	1,32 hijk	0,50 e
B10	1	0,1	1,22 gh	1,09 k	0,57 cde
B11	1	0,5	2,28 abc	1,42 ghi	0,83 b
B12	1	1,0	1,45 fgh	1,42 ghi	0,64 cde
B13	2	0	1,50 efg	1,24 jk	0,57 cde
B14	2	0,1	1,33 fgh	1,13 jk	0,58 cde
B15	2	0,5	2,61 a	1,57 efg	0,70 bcd
B16	2	1,0	1,50 efg	1,36 hij	0,54 de
B17	3	0	2,58 a	1,79 cde	0,69 bcd
B18	3	0,1	1,50 efg	1,39 ghi	0,58 cde
B19	3	0,5	2,44 ab	1,46 fghi	0,58 cde
B20	3	1,0	1,67 def	1,09 k	0,57 cde

* Prosečne vrednosti za ispitivane parametre koje su u istoj koloni obeležene istim slovima nisu statistički značajno različite – Duncan-ov test višestrukih intervala za $P < 0,05$ /Means followed by the same letter within columns are not significantly different at the $P < 0.05$ level of significance using Duncan's Multiple Range Test



a)



b)



c)



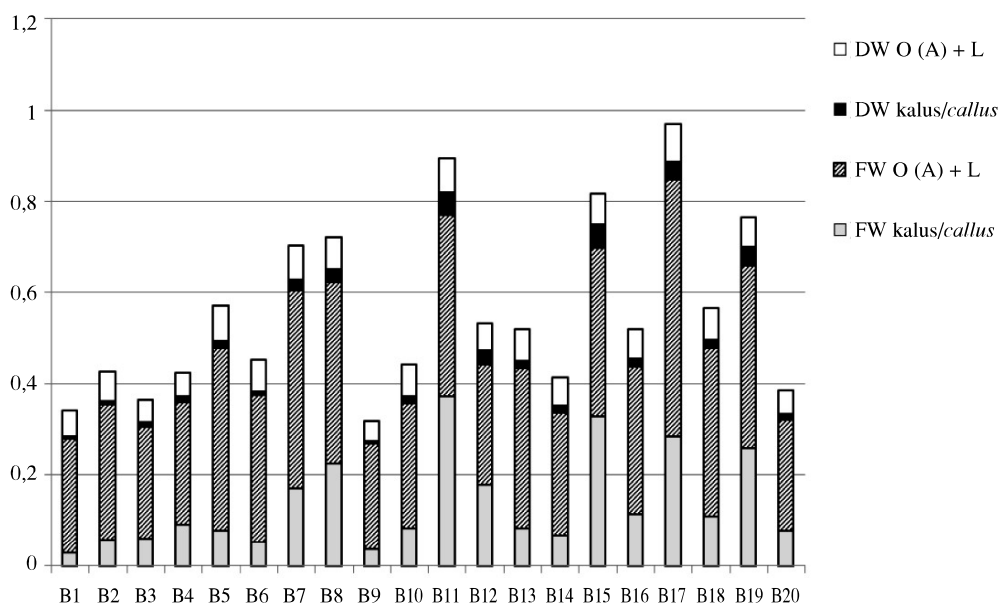
d)

Sl. 1. Izdanci podloge za trešnju Gisela 5 na medijumu sa: a) 2 mg l^{-1} BA + $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA; b) 3 mg l^{-1} TDZ + 1 mg l^{-1} IBA; c) $0,4 \text{ mg l}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IBA; d) $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ KIN + $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA

Fig. 1. Shoots of sweet cherry rootstock Gisela 5 on medium with: a) 2 mg l^{-1} BA + $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA; b) 3 mg l^{-1} TDZ + 1 mg l^{-1} IBA; c) $0,4 \text{ mg l}^{-1}$ 2iP + $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IBA; d) $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ KIN + $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA

Međutim, na medijumima sa najnižom koncentracijom KIN ($0,2 \text{ mg l}^{-1}$) u kombinaciji sa svim korišćenim koncentracijama IBA ($0,1$, $0,5$ i 1 mg l^{-1}) uočena je rizogeneza, dostižući čak do 66,7% ožiljenih bi-

ljaka ($0,2 \text{ mg l}^{-1}$ KIN i 1 mg l^{-1} IBA) (Tab. 4). Ožiljene biljke su imale izuzetno velike, tamnozeleno-žute, dobro razvijene i bele, radijalne korenove sa ružičastom pigmentacijom vrhova (Sl. 1 d).

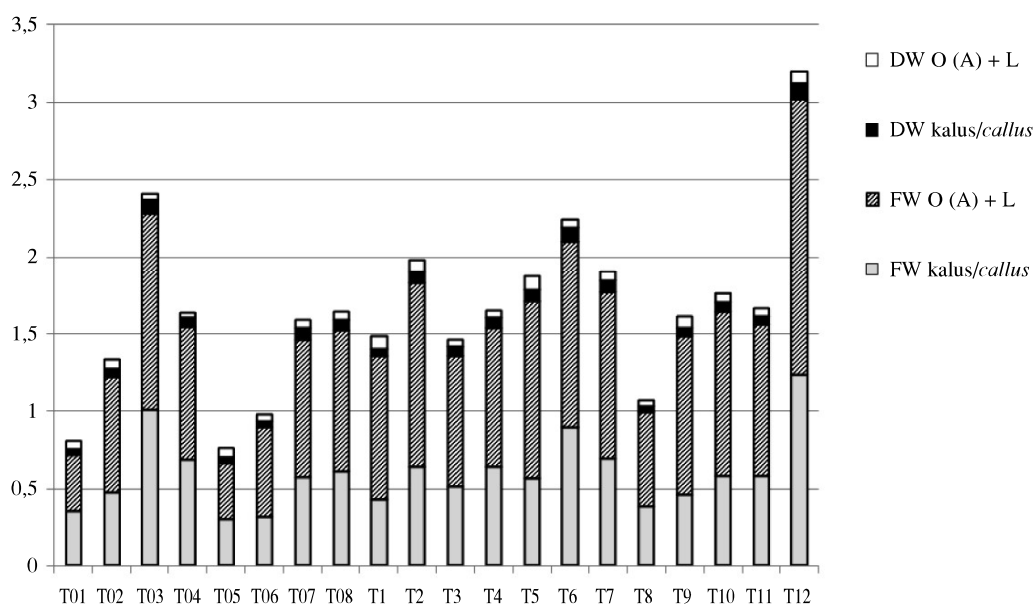


Graf. 1. Sveža i suva masa izdanaka (u g) podloge za trešnju Gisela 5 na medijumima sa BA; *O (osovinski) + L (lateralni izdanci)
 Graph 1. Fresh and dry shoot weight (in g) of sweet cherry rootstock Gisela 5 on media with BA; *A (axial) + L (lateral shoots)

Tab. 2. Multiplikacija *in vitro* podloge za trešnju Gisela 5 na medijumima sa TDZ
 Multiplication *in vitro* of sweet cherry rootstock Gisela 5 on media with TDZ

Oznaka medijuma Mark of media	TDZ (mg l ⁻¹)	IBA (mg l ⁻¹)	Indeks multiplikacije Multiplication index	Dužina osovinskog izdanka Length of axial shoot (cm)	Dužina bočnih izdanaka Length of lateral shoots (cm)
T01	0,2	0	1,00 c*	1,36 a	–
T02	0,2	0,1	1,17 bc	1,14 bc	0,60 a
T03	0,2	0,5	1,00 c	1,12 bcd	–
T04	0,2	1,0	1,00 c	0,71 g	–
T05	0,4	0	1,11 bc	0,92 ef	0,50 b
T06	0,4	0,1	1,00 c	0,98 cde	–
T07	0,4	0,5	1,00 c	1,24 ab	–
T08	0,4	1,0	1,00 c	1,21 ab	–
T1	1	0	1,17bc	1,21 ab	0,53 ab
T2	1	0,1	1,17 bc	1,12 bcd	0,50 b
T3	1	0,5	1,00 c	0,96 de	–
T4	1	1,0	1,17 bc	0,88 ef	0,50 b
T5	2	0	1,17 bc	1,33 a	0,50 b
T6	2	0,1	1,39 ab	0,92 ef	0,50 b
T7	2	0,5	1,50 a	0,94 ef	0,52 ab
T8	2	1,0	1,06 c	0,69 g	0,50 b
T9	3	0	1,56 a	0,90 ef	0,50 b
T10	3	0,1	1,00 c	1,23 ab	–
T11	3	0,5	1,00 c	0,88 ef	–
T12	3	1,0	1,56 a	0,77 fg	0,50 b

* Prosečne vrednosti za ispitivane parametre koje su u istoj koloni obeležene istim slovima nisu statistički značajno različite – Duncan-ov test višestrukih intervala za $P < 0,05$ /Means followed by the same letter within columns are not significantly different at the $P < 0.05$ level of significance using Duncan's Multiple Range Test

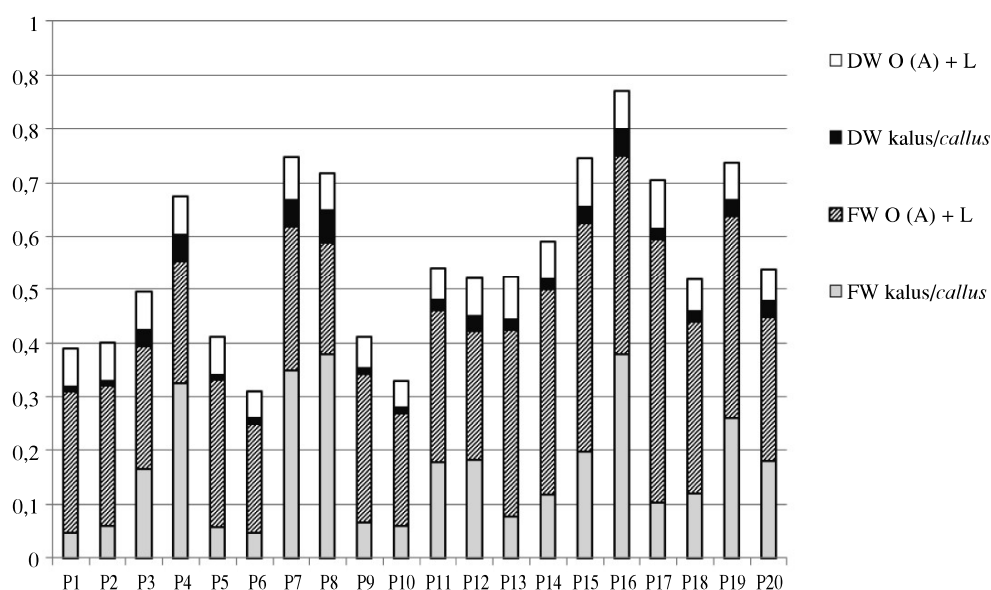


Graf. 2. Sveža i suva masa izdanaka (u g) podloge za trešnjju Gisela 5 na medijumima sa TDZ; *O (osovinski) + L (lateralni izdanci)
 Graph 2. Fresh and dry shoot weight (in g) of sweet cherry rootstock Gisela 5 on media with TDZ; *A (axial) + L (lateral shoots)

Tab. 3. Multiplikacija *in vitro* podloge za trešnjju Gisela 5 na medijumima sa 2iP
 Multiplication *in vitro* of sweet cherry rootstock Gisela 5 on media with 2iP

Oznaka medijuma Mark of media	2iP (mg l ⁻¹)	IBA (mg l ⁻¹)	Indeks multiplikacije Multiplication index	Dužina osovinškog izdanaka Length of axial shoot (cm)	Dužina bočnih izdanaka Length of lateral shoots (cm)	% ožiljenih izdanaka Rooted shoots (%)
P1	0,2	0	1,00 ns*	1,31 def**	–	–
P2	0,2	0,1	1,00	1,36 cdef	–	–
P3	0,2	0,5	1,00	1,35 cdef	–	5,56
P4	0,2	1,0	1,00	1,33 cdef	–	11,11
P5	0,4	0	1,00	1,50 bcd	–	–
P6	0,4	0,1	1,00	1,43 cde	–	–
P7	0,4	0,5	1,00	1,29 defg	–	5,56
P8	0,4	1,0	1,00	1,22 efg	–	16,67
P9	1	0	1,00	1,27 defg	–	–
P10	1	0,1	1,00	1,00 h	–	–
P11	1	0,5	1,00	1,14 fgh	–	–
P12	1	1,0	1,00	1,10 gh	–	–
P13	2	0	1,00	1,56 bc	–	–
P14	2	0,1	1,00	1,46 cd	–	–
P15	2	0,5	1,00	1,88 a	–	–
P16	2	1,0	1,00	1,71 ab	–	–
P17	3	0	1,00	1,88 a	–	–
P18	3	0,1	1,00	1,70 ab	–	–
P19	3	0,5	1,00	1,36 cdef	–	–
P20	3	1,0	1,00	1,11 gh	–	–

*ns – nema značajnih razlika; **Prosečne vrednosti za ispitivane parametre koje su u istoj koloni obeležene istim slovima nisu statistički značajno različite – Duncan-ov test višestrukih intervala za $P < 0,05$ /*ns – non significant; **Means followed by the same letter within columns are not significantly different at the $P < 0.05$ level of significance using Duncan's Multiple Range Test

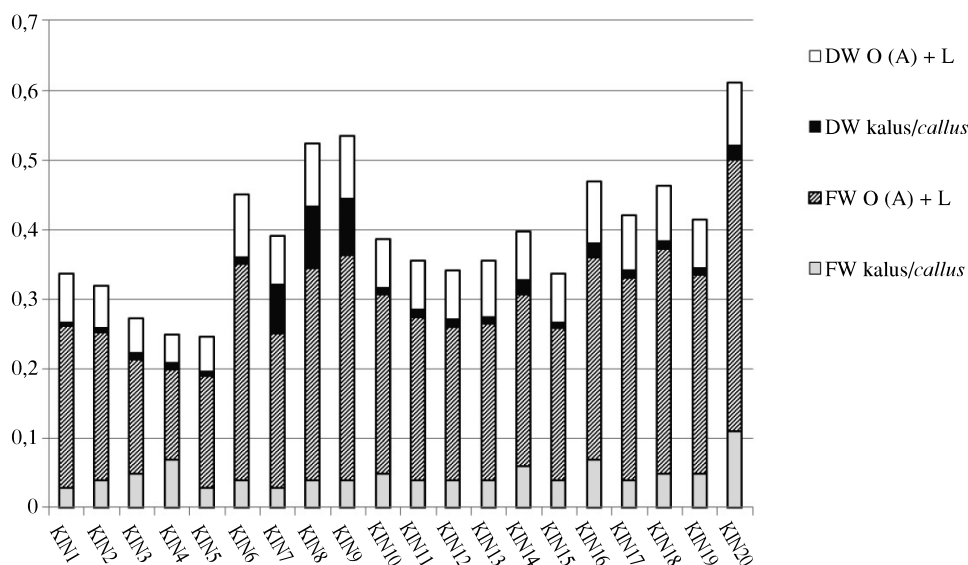


Graf. 3. Sveža i suva masa izdanaka (u g) podloge za trešnju Gisela 5 na medijumima sa 2iP; *O (osovinski) + L (lateralni izdanci)
 Graph 3. Fresh and dry shoot weight (in g) of sweet cherry rootstock Gisela 5 on media with 2iP; *A (axial) + L (lateral shoots)

Tab. 4. Multiplikacija *in vitro* podloge za trešnju Gisela 5 na medijumima sa KIN
 Multiplication *in vitro* of sweet cherry rootstock Gisela 5 on media with KIN

Oznaka medijuma Mark of media	KIN (mg l ⁻¹)	IBA (mg l ⁻¹)	Indeks multiplikacije Multiplication index	Dužina osovinskog izdanka Length of axial shoot (cm)	Dužina bočnih izdanaka Length of lateral shoots (cm)	% ožiljenih izdanaka Rooted shoots (%)
KIN1	0,2	0	1,00 ns*	1,39 cd**	—	5,56
KIN2	0,2	0,1	1,00	1,31 cde	—	22,22
KIN3	0,2	0,5	1,00	1,02 hi	—	22,22
KIN4	0,2	1,0	1,00	0,90 i	—	66,67
KIN5	0,4	0	1,00	1,09 gh	—	—
KIN6	0,4	0,1	1,00	1,19 efg	—	—
KIN7	0,4	0,5	1,00	1,00 hi	—	—
KIN8	0,4	1,0	1,00	1,41 bcd	—	—
KIN9	1	0	1,00	1,37 cd	—	—
KIN10	1	0,1	1,00	1,16 fg	—	—
KIN11	1	0,5	1,00	1,16 fg	—	—
KIN12	1	1,0	1,00	1,02 hi	—	—
KIN13	2	0	1,00	1,19 efg	—	—
KIN14	2	0,1	1,00	1,22 ef	—	—
KIN15	2	0,5	1,00	1,00 hi	—	—
KIN16	2	1,0	1,00	1,29 de	—	—
KIN17	3	0	1,00	1,42 bc	—	—
KIN18	3	0,1	1,00	1,50 b	—	—
KIN19	3	0,5	1,00	1,24 ef	—	—
KIN20	3	1,0	1,00	1,67 a	—	—

*ns – nema značajnih razlika; **Prosečne vrednosti za ispitivane parametre koje su u istoj koloni obeležene istim slovima nisu statistički značajno različite – Duncan-ov test višestrukih intervala za $P < 0,05$ /*ns – non significant; **Means followed by the same letter within columns are not significantly different at the $P < 0.05$ level of significance using Duncan's Multiple Range Test



Graf. 4. Sveža i suva masa izdanaka (u g) podloge za trešnju Gisela 5 na medijumima sa KIN; *O (osovinski) + L (lateralni izdanci)
Graph 4. Fresh and dry shoot weight (in g) of sweet cherry rootstock Gisela 5 on media with KIN; *A (axial) + L (lateral shoots)

Diskusija

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da postoje razlike u delovanju i usvajanju citokinina, prepoznavanju od strane ćelija ili mehanizmima njihovog delovanja. Tako se citokinini prema svom dejstvu u našem ogledu mogu podeliti u dve grupe: vrlo aktivna grupa gde spada samo BA, i slabo aktivna grupa sa TDZ, 2iP i KIN koji su pokazali slabiji uticaj na fazu multiplikacije podloge za trešnju Gisela 5. Slični rezultati su dobijeni sa nekim drugim vrstama voćaka kao što su: trešnja cv Lapins (Ružić & Vujović, 2008), kruška *Pyrus pyrifolia* N. (Kadota & Niimi, 2003) koji su takođe uočili da BA ima bolji efekat nego TDZ ili KIN, odnosno da je BA pogodniji za multiplikaciju nego derivati fenilurea. Veća regeneraciona sposobnost je takođe dobijena kada je korišćen BA u odnosu na TDZ i meta-topolin kod *Prunus microcarpa* subsp. *tortusa* (Nas et al., 2010), i bolja inicijacija i izduživanje novoformiranih izdanaka leske *Corylus avellana* L. (Thompson & Deering, 2011).

Citokinin TDZ uglavnom utiče na povećanje formiranja izdanaka, odnosno multiplikaciju *in vitro* kod mnogih drvenastih kultura i pokazao se efektivniji od derivata purina, ali kod nekih vrsta je imao slabiji

uticaj (Ružić & Vujović, 2008; Huetteman & Preece, 1993). Mihailović-Bošnjak et al. (2012) u ogledima sa takođe podlogom za trešnju Gisela 5, su zaključili da bi se TDZ mogao koristiti u nižim koncentracijama za aksilarnu multiplikaciju. Upravo su Bijelić et al. (2006) dobili bolju multiplikaciju genotipa Gisela 5, ali sa znatno nižim koncentracijama TDZ u odnosu na one korišćene u ovom radu. Međutim, Huetteman & Preece (1993) su ukazali na jednu negativnu pojavu uzrokovanu dejstvom TDZ, kao što je inhibicija izduživanja izdanaka, što je potvrđeno i u ovim istraživanjima u poređenju sa efektom ostalih citokinina.

Kod nekih drugih biljnih vrsta, kao što je endemična vrsta *Decaleptis Hamiltonii*, najbolja multiplikacija je dobijena sa 2iP, u poređenju sa KIN, BA i TDZ (Giridhar et al., 2005). Pored veoma izduženih izdanaka u nekim kombinacijama ogleda sa velikom masom kalusa, ovaj citokinin nije imao pozitivan uticaj na Gisela 5. Augusto (2001) je upoređujući različite citokinine zapazio da 2iP, zeatin, kinetin i TDZ utiču na slabiju produkciju izdanaka po eksplantatu u odnosu na BA kod multiplikacije borovnice sorte Brazos. Podloga za breskvu Flordaguard hibrid između *Prunus persica* x *Prunus davidiana* u tretmanima sa 2iP i zeatinom je imala slabu multiplikaciju *in vitro*, ali je BA u različitim testiranim koncentracijama, a posebno do

3,66 mg l⁻¹ povećao procenat multiplikacije (Radmann *et al.*, 2011).

Ružić & Vujović (2008) su pokazali da KIN ima slabi uticaj na multiplikaciju trešnje cv Lapins, a Mansseri-Lamrioui *et al.* (2011) su takođe potvrdili da KIN ima slabi uticaj na multiplikaciju trešnje *Prunus avium* L.

U našem ogledu zapažena je i pojava rizogeneze u fazi multiplikacije na medijumima sa KIN i 2iP, a što je dobijeno i sa trešnjom cv Lapins (Ružić & Vujović, 2008). Pojava ožiljavanja u fazi multiplikacije na medijumima sa KIN, čak i kada nisu kombinovani sa auksinom je retka kod voćnih vrsta. Christianson & Warnick (1983) su postavili postulat da sposobnost da se formira određeni organ može biti vođena u zavisnosti od odgovarajućeg odnosa auksin/citokinin.

Zaključak

Dobijeni rezultati ukazuju da je izbor citokinina za fazu multiplikacije (u odnosu na sve praćene parametre) podloge za trešnju Gisela 5 ograničen na upotrebu BA.

Koncentracija citokinina BA od 2 mg l⁻¹ u kombinaciji sa 0,5 mg l⁻¹ IBA je dala najbolju multiplikaciju, a koncentracija od 0,4 mg l⁻¹ BA je bila najbolja za dužinu izdanaka.

Međutim, za brzu mikropropagaciju sjedinjavanjem faze ožiljavanja i multiplikacije može se koristiti i KIN, a za dobijanje snažnih izdanaka (u fazi izduživanja koja prethodi fazi ožiljavanja) mogu se koristiti KIN i 2iP.

Na osnovu dugogodišnjeg rada u oblasti mikropropagacije *in vitro*, i dobijenih rezultata može se nesumnjivo zaključiti da izbor tipa i koncentracije citokinina za uspešnu mikropropagaciju zavisi od biljne vrste, odnosno genotipski je zavistan.

Zahvalnica/Acknowledgements

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

The present work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (projects No. TR-20013 and TR-31064).

Literatura

- Augusto C.S.S. (2001): Micropropagação de amoreira-preta cv. Brazos. Dissertação, Mestrado em Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil, 30: 266–270.
- Bijelić S., Gološin B., Cerović S. (2006): Uticaj TDZ na *in vitro* umnožavanje podloge Gisela 5. Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta, 30, 1: 100–104.
- Christianson M.L., Warnick D.A. (1983): Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Developmental Biology*, 95(2): 288–293.
- Girdhar P., Gururaj H.B., Ravishankar G.A. (2005): *In vitro* shoot multiplication through shoot tip cultures of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., a threatened plant endemic to southern India. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 41(1): 77–80.
- Huetteman C.A., Preece J.E. (1993): Thidiazuron a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 33(2): 105–119.
- Jaakola L., Tolvanen A., Laine K., Hohtola A. (2001): Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 66(1): 73–77.
- Kadota M., Niimi Y. (2003): Effect of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 72(3): 261–265.
- Long L. (2009): Choosing the right cherry rootstock. [online] Corvallis: Oregon State University, Available at: <http://> [Accessed 4 November 2013].
- Mansseri-Lamrioui A., Louerguioui A., Bonaly J., Yakoub-Bougdal S., Allili N., Gana-Kebbouche S. (2011): Proliferation and rooting of wild cherry: The influence of cytokinin and auxin types and their concentration. *African Journal of Biotechnology*, 10(43): 8613–8624.
- Mihailović-Bošnjak A., Kereša S., Habuš-Jerčić I., Barić M. (2012): The effect of cytokinin type and explant orientation on axillary shoot proliferation and *in vitro* rooting of Gisela 5 cherry rootstock. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10(3&4): 616–620.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–479.
- Nacheva L., Gercheva P. (2009): Micropropagation of Gisela 5 (cherry dwarf rootstock): the effect of a type and the concentration of the carbohydrates in the nutrient medium. *Proceedings of I Balcan Symposium on Fruit Growing, Acta Horticulturae*, 825: 261–268.
- Nas N.M., Bolek Y., Sevgin N. (2010): The effects of explant and cytokinin type on regeneration of *Prunus microcarpa*. *Scientia Horticulturae*, 126(2): 88–94.
- Ostrolucká M.G., Libiaková G., Ondruškova E., Gajdošova A. (2004): *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis Biology*, 676: 207–212.

- Radmann E.B., Bianchi V., Fachinello J.C., Ferreira L.V., Pedrosa de Oliveira R. (2011): *In vitro* multiplication of 'Flordaguard' rootstock: cytokinin source and concentration effects, explants orientation and period of permanence in the culture medium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(1): 25–34.
- Ružić Dj., Cerović R. (1985): The effect of plant growth regulators on the rooting phase of plum cv Požegača by the method of tissue culture *in vitro* (Uticaj fitoregulatora na fazu ožiljavanja šljive cv Požegače metodom kulture tkiva *in vitro*). *Yugoslav Pomology (Jugoslovensko voćarstvo)*, 19: 383–388.
- Ružić Dj., Sarić M., Cerović R., Čulafić Lj. (2000): Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 63 (1): 9–14.
- Ružić Dj., Sarić M., Cerović R., Čulafić Lj. (2001): Changes in macroelement content of the media and in sweet cherry Inmil GM 9 shoots during *in vitro* culture. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76(3): 295–299.
- Ružić Dj.V., Vujović T.I. (2008): The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). *Horticultural Science (Prague)*, 35(1): 12–21.
- Thompson G.E., Deering T.D. (2011): Effect of cytokinin type and concentration on *in vitro* shoot proliferation of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 39(3): 209–213.

THE EFFECTS OF CYTOKININ TYPES AND THEIR CONCENTRATION ON *IN VITRO* MULTIPLICATION OF SWEET CHERRY ROOTSTOCK GISELA 5**Đurđina Ružić¹, Tatjana Vujović¹, Radosav Cerović², Dragana Vranić¹**¹*Fruit Research Institute, Kralja Petra I 9, 32000 Čačak, Republic of Serbia**Email: djinaruzic@gmail.com*²*Innovation Center, Faculty of Technology and Metallurgy, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Republic of Serbia***Abstract**

The most important aspect of successful micropropagation, among other *in vitro* factors, is to use the optimal types and concentrations of plant growth regulators. With the aim of optimization of *in vitro* multiplication of cherry rootstock Gisela 5 the effect of different cytokinins have been studied: benzyladenine (BA), isopentenyl adenine (2iP), kinetin (KIN) and thidiazuron (TDZ) at concentrations of 0.2, 0.4, 1, 2 and 3 mg l⁻¹, singly and combined with auxine, indole-3-butyric acid (IBA) at concentrations of 0.1, 0.5, and 1 mg l⁻¹. Murashige and Skoog (1962) was the basic medium used in all combinations. The following multiplication parameters were monitored: multiplication index, length of axial and lateral shoots. Fresh and dry shoot weight (callus and shoots – axial and lateral stem with leaves) was also determined. Some specific issues, such as colour, leaf and callus size, incidence of chlorosis or necrosis along with occurrence of rhizogenesis, were also monitored. The highest multi-

plication index was obtained on medium with 2 and 3 mg l⁻¹ BA, however the highest length of axial and lateral shoots was obtained on media with 0.4 mg l⁻¹ BA. Generally, very poor multiplication was achieved on media with 2iP, KIN and TDZ whereas in many utilized combinations with 2iP and KIN, and particularly in those with KIN rhizogenesis was induced. Obtained results suggest that the choice of cytokinins for the phase of multiplication (in regard to all monitored parameters) of cherry rootstock Gisela 5 is limited to BA. However, for more rapid micropropagation, through joining rooting and multiplication phases, KIN may be applied. For obtainment of robust shoots (in elongation phase, prior to rooting) KIN and 2iP may also be used.

Key words: cytokinins, cherry rootstock, *in vitro* multiplication, root induction