

Uspostavljanje aseptične kulture *in vitro* novih vegetativnih podloga za trešnju, krušku i šljivu

Đurđina Ružić, Radosav Cerović, Tatjana Vujović

Institut za voćarstvo, 32000 Čačak, Kralja Petra I 9, Srbija
E-mail: jugvocca@yu1.net

Primljeno: 30. oktobra, 2009; prihvaćeno: 27. novembra, 2009.

Rezime. Procedura sterilizacije eksplantata, kao prva faza mikropropagacije je veoma važna za uspešnost organogeneze, posebno ako se početni eksplantati uzimaju iz otvorenog polja, odnosno voćnjaka, ili iz staklara i mrežanika.

Standardna procedura površinske sterilizacije, vremenski modifikovana je primenjena na podlogama Gisela 5, Pyrodwarf i Fereley Jaspi. Dve vrste eksplantata su korišćene: pupoljci sa grančica držanih u laboratorijskim uslovima i sa grančica poreklom iz mrežanika.

Najveći % indukovanih lisnih rozeta dobijen je uzimanjem eksplantata iz laboratorijskih uslova, posebno kod podloge Gisela 5, 82,7%.

Ključne reči: nove podloge voćaka, procedura sterilizacije, vrsta eksplantata, indukcija lisne rozete

Uvod

Mikropropagacija je kao metoda vegetativnog razmnožavanja, od svih *in vitro* tehnika, našla najviši nivo praktične primene u voćarstvu. Najdalji korak je napravljen kod jagodastih vrsta voćaka i vegetativnih podloga. Poslednjih godina u savremenom voćarstvu sve se više ide na gustu sadnju za koju se koriste slabo bujne podloge, pa je tim pre opravdana primena ove metode za brzo razmnožavanje i uvođenje u proizvodnju zdravih i kvalitetnih podloga. U mnogim rasadnicima širom sveta ova metoda je standardna metoda za razmnožavanje nekih vrsta voćaka. Tako, npr., vegetativna podloga za trešnju, Gisela 5, najaktuelnija i najviše tražena na svetskom tržištu, se uglavnom razmnožava ovom metodom (Ružić i Cerović, 2003).

Primena ove metode u razmnožavanju vegetativnih podloga je inicirana 70-tih godina XX veka, upra-

vo na samom početku primene mikropropagacije. Sledećih 20-tak godina razvijen je veliki broj protokola za razmnožavanje podloga za različite kontinentalne vrste voćaka, pa su sa uspehom *in vitro* razmnožene i vegetativne podloge za: trešnju i višnju – Vladimir (Cosio et al., 1981), Colt (Ružić i Cerović, 1987), 11 ekotipova *Prunus mahaleb* (Dradi et al., 1996), Maxma-14 (Hepaksoy, 2004), F12/1 (Grant i Hammatt, 1999), Damil GM 61/1 (Ružić et al., 2007); za šljivu – Damasco 1869, GF43, San Giuliano 655/2 (Zuccherelli, 1979), Pixy (*P. insititia*) (Jones i Hopgood, 1979), S1 klon (*P. domestica*) i S2 (*P. insititia*) (Rosati i Marino, 1980), džanarika (Hammersschlag, 1982); za breskvu – GF 677 (Ružić et al., 1984) i mnogi dr.

Istraživanja su prisutna i u novije vreme i najviše su bazirana na izučavanju uticaja hormonskog sastava medijuma na faze mikropropagacije, ali i uticaja mineralnog sastava medijuma, različitih vrsta i koncentra-

cija ugljenih hidrata ili nekih alternativnih supstanci sa citokininskom aktivnošću, na mikropropagaciju podloga za trešnju Gisela 5, Inmil GM 9, Camil GM 79, Damil i podloge za krušku Pyrodwarf (Ružić et al., 2000; Ružić i Cerović, 2001; Ružić et al., 2001; Ružić et al., 2003; Ružić et al., 2004; Ružić et al., 2008; Ružić et al., 2009).

Funkcija I faze mikropropagacije je uspostavljanje aseptične, odnosno sterilne kulture *in vitro*. Prema Hartmannu i Kesteru (1983) faktori koji utiču na uspeh ove faze su: izbor eksplantata, eliminacija kontaminacije eksplantata, odnosno sterilizacija eksplantata, uslovi gajenja početnih kultura (svetlost, temperatura...).

S obzirom da je uspostavljanje sterilne kulture veoma značajna i najosetljivija faza mikropropagacije, od čega zavisi i dalji uspeh metode, cilj rada je bio da se razradi protokol za uspešnu površinsku sterilizaciju aktuelnih vegetativnih podloga za trešnju, krušku i šljivu.

Materijal i metode

Biljni materijal. Zbog svoje aktuelnosti u voćarstvu korišćene su slabo bujne podloge za trešnju, Gisela 5 (148/2, interspecijes hibrid *Prunus cerasus* x *Prunus canescens*); za krušku, Pyrodwarf (clone BU 5-18, Old Home x Bonne Louise d'Avranches); i šljivu Fereley Jaspí (*Prunus salicina* „Methley“ x *Prunus spinosa*).

Vrsta ekplantata. Bezvirusne podloge su uvezene iz Nemačke (Lodder, Unterlagen Ltd.) u okviru projekta Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede RS: „Uvođenje certifikacije u proizvodnju sadnog materijala voćaka (dobijanje osnovnog štoka i zasnivanje matičnjaka sorti i podloga voćnih vrsta)“. Biljke su posle testiranja na eventualno prisustvo virusa sađene u sterilan supstrat i držane u uslovima mrežanika (Sl. 1 a). Kao početni eksplantati uzimani su pupoljci sa grančica direktno sa ovih biljaka u mrežaniku, početkom maja meseca. Druga vrsta ekplantata (samo za Giselu 5 i Pyrodwarf) je poreklom iz laboratorijskih uslova, odnosno postavljane su grančice sa vegetativnim pupoljcima u periodu dubokog zimskog mirovanja (januar mesec) u posudu sa vodom u laboratorijskim uslovima (prosečna temperatura ± 20 °C), i po otvaranju pupoljaka (februar mesec) uvođeni su u proceduru sterilizacije.

Površinska sterilizacija. Korišćena je standardna procedura sterilizacije koja je vremenski modifikovana. Eksplantati su ispirani u protočnoj vodi 1,5–2,0 časa, zatim 1' 20" u 70% etanolu, 12 min u 10% „Varikini“ (komercijalni proizvod sa 4% aktivnog hlora) i 3 puta ispirani sterilnom vodom.

Inicijacija rozete. Pupoljci veličine 0,5–0,8 cm su postavljani na medijum Murashige i Skoog (1962) (MS) sa u mg l⁻¹: 6-benzil-aminopurin (BAP) 2,0; indol- β -buterna kiselina (IBA) 0,5; gibberelna kiselina (GA₃) 0,1; agar i saharoza u koncentraciji od 7.000, odnosno 20.000 mg l⁻¹, resp.

Multiplikacija. Po uspostavljanju sterilne kulture inicirane lisne rozete su prenete na medijum za multiplikaciju koji je sadržavao MS mineralne soli i organski kompleks sa u mg l⁻¹: BAP 1,0; IBA 0,1 i; GA₃ 0,1 (za podloge Gisela 5 i Fereley Jaspí), a BAP 0,5; α -naftil sirćetna kiselina (NAA) 0,1; i GA₃ 0,1 (za podlogu Pyrodwarf).

Uslovi za gajenje kultura. Kulture su gajene u klimatizovanoj prostoriji sa kontrolisanom temperaturom (23 \pm 1 °C), fotoperiodom (16/8 h, svetlost/mrak) i intenzitetom svetlosti na površini kultura od 8,83 Wm⁻², obezbeđenim sa belim fluorescentnim lampama, jačine 40 W, 6.500 K.

U radu su praćeni parametri uspešnosti uspostavljanja aseptične kulture: procenat početnih eksplantata koji je kontaminiran, nekrotirao i inicirao lisnu rozetu, kao i indeks multiplikacije, dužina osovinskog i bočnih izdanaka u prvoj supkulturi.

Za obradu podataka korišćena je analiza varijanse (ANOVA), kao i pojedinačni Dankanov višestruki test intervala, za $p < 0,05$.

Rezultati i diskusija

Faza uspostavljanja aseptične kulture je jedna od najosetljivijih i najtežih faza u proceduri mikropropagacije. Uglavnom se početni eksplantati uzimaju iz polja u početku i u toku vegetacije, pa je procenat zaraženosti takvog materijala veoma veliki. Zbog toga se često matične/donor biljke sa kojih se uzimaju eksplantati gaje u staklarama, plastenicima ili mrežanicima, gde se kontrolisano tretiraju pesticidima. Međutim, i pored kontrolisanog gajenja takvih biljaka procenat kontaminacije može biti veliki.

Prema Hartmannu i Kesteru (1983) postoje eksterni patogeni koji su prisutni na eksplantatima i interni patogeni koji su endogeni i prisutni u eksplantatima. Eksterna kontaminacija uključuje gljive, bakterije i dr. mikroorganizme i oni se mogu kontrolisati dezinfekcijom eksplantata i radnog prostora. Međutim, interni patogeni su prisutni u tkivu eksplantata i teže se odstranjuju u šta spadaju virusi, organizmi slični virusima, ali i gljive i bakterije.

Murashige (1974) je između mnogih faktora koji imaju uticaja na uspostavljanje aseptične kulture, apofirose sezonu uzimanja eksplantata kao veoma važnu, kao i vrstu ekplantata, veličinu i kvalitet cele donor biljke. Kontaminacije su uglavnom na površini biljnih delova pa je zato važno poreklo i mesto gajenja donor biljke. Poznata je činjenica da biljke koje rastu u humidnoj atmosferi, omogućavaju micelijama gljiva da prodru u unutrašnjost tkiva i tako postanu problem za sterilnost eksplantata. Generalno, donor biljke koje su rasle u zaštićenom prostoru u staklarama ili mrežanicama su mnogo bolji izvor eksplantata od onih gajenih u polju, odnosno zasadima voćaka. Hartmann i Kester (1983) još preporučuju da se u staklarama/mrežanicama izbegava svako prskanje, odnosno vlaženje oko donor biljke i čak obezbeđenje suvljih uslova do 3 nedelje, kako bi se kontaminacije smanjile, a kod onih gajenih na otvorenom, pokrivanje grančica sa plastičnim kesama i tretiranje fungicidima.

Da kvalitet, odnosno zaraženost donor biljke ima uticaja na uspostavljanje sterilne kulture pokazali su i dobijeni rezultati (Tab. 1). Kod podloge Gisela 5 i Pyrodwarf, koje su imale i komparativni ogled, znatno bolji rezultati su dobijeni sa eksplantatima poreklom

sa grančica iz laboratorijskih uslova. Tako je, kod podloge Gisela 5 dobijen i najveći % iniciranih lisnih rozeta, čak 82,7% od eksplantata upravo poreklom iz laboratorijskih uslova, što je znatno bolje u poređenju sa korišćenjem eksplantata iz mrežanika (28,3% iniciranih rozeta) (Tab. 1). Promena, t.j. korišćenje dezinfektanta kao što je DICA, kod istog genotipa, nije dalo bolje rezultate (42,9% indukovalo rozetu, 28,6% kontaminiranih i 28,6% potamnelih eksplantata) (Osterc et al., 2004). Podloga Fereley Jaspi, kod koje su eksplantati uzimani samo iz mrežanika, dala je zadovoljavajući % iniciranih rozeta, 46,9% (Tab. 1).

Sve inicirane lisne rozete su bili dobro razvijene i sa početnom multiplikacijom (Sl. 1 b, c, d). Sa ovom kompozicijom/sastavom medijuma dobijeni su brojni, veoma dobri rezultati u iniciranju lisnih rozeta različitih vrsta voćaka u laboratoriji za kulturu tkiva *in vitro* Instituta za voćarstvo u Čačku.

Za dezinfekciju *in vitro* se koriste hemijska sredstva koja su toksična za mikroorganizme, ali relativno netoksična za biljni materijal. Najčešće se koristi kalcijum hipohlorit [$\text{Ca}(\text{ClO})_2$] i natrijum hipohlorit (NaOCl , kao komercijalni proizvod sa 4% aktivnog hlorida). Međutim kod nekih kultura sterilizacija je rađena i sa drugim dezinfektantima, kao npr. rastvorom živinog hlorida (HgCl_2) i Tween-a, kod borovnice, brusnice i maline (Gajdosova et al., 2006), ili Na_2 soli dicloroisocyanuric kiseline (DICA) kod nekih vrsta *Prunus*-a (Osterc et al., 2004), sa manje ili više uspeha.

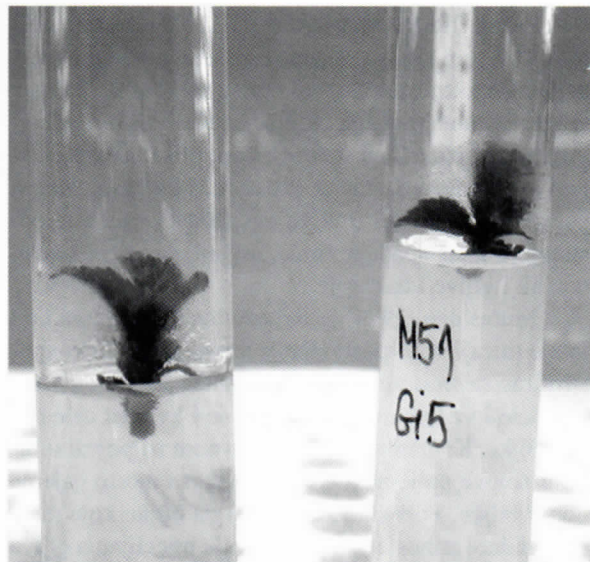
Međutim i vreme držanja eksplantata u tim dezinfektantima je važno za oštećenje živih tkiva, pa se mora iznaći najpogodniji tretman, često za svaku kulturu posebno. Zato i tretiranje eksplantata sa alkoholom

Tab. 1. Uspostavljanje aseptične kulture
Establishment of aseptic culture

| Genotip <i>Genotype</i> | Vrsta eksplantata <i>Type of explants</i> | Kontaminirano eksplantata <i>Infected explants</i> (%) | Potamnelo eksplantata <i>Browned explants</i> (%) | Inicijacija rozete <i>Initiation of rosette</i> (%) |
|----------------------------|--|---|--|---|
| Gisela 5 | Iz mrežanika/ <i>From the screen house</i> | 71,7 a | – | 28,3 d |
| | Sa grančica iz lab./ <i>From the lab</i> | 12,0 d | 5,3 b | 82,7 a |
| Pyrodwarf | Iz mrežanika/ <i>From the screen house</i> | 54,2 b | – | 45,8 c |
| | Sa grančica iz lab./ <i>From the lab</i> | 25,0 c | 12,5 a | 60,4 b |
| Fereley Jaspi | Iz mrežanika/ <i>From the screen house</i> | 48,1 b | 4,9 b | 46,9 c |



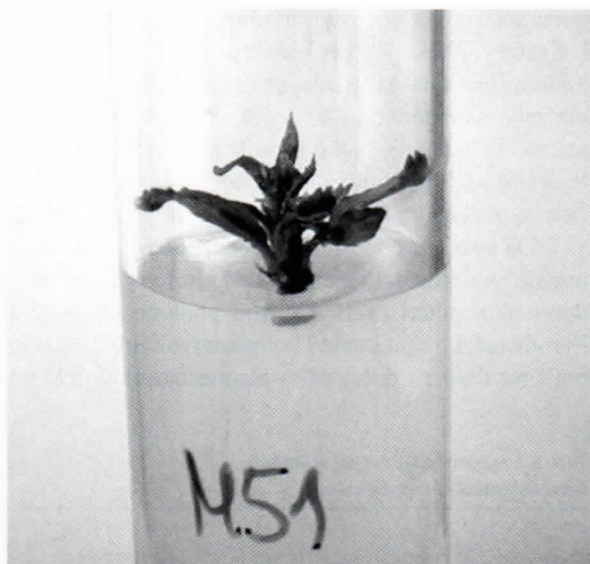
a)



b)



c)



d)

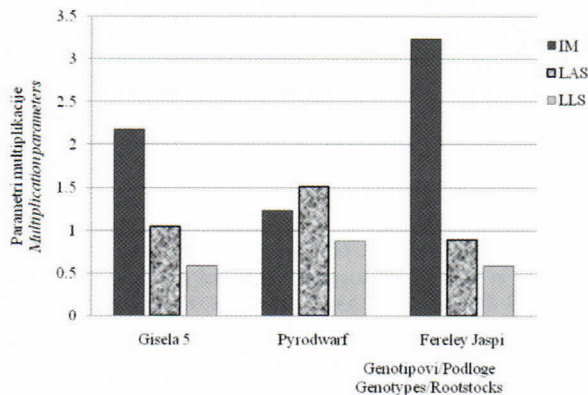
Sl. 1. Bezvirusne sadnice (donor biljke) podloga za trešnju, krušku i šljivu u mrežaniku Instituta za voćarstvo u Čačku (a); uspostavljanje aseptične kulture – inicijacija rozete: podloge za trešnju Gisela 5 (b); za krušku Pyrodwarf (c) i; šljivu Fereley Jaspi (d)

Virus free nursery stock (donor fruits) of rootstocks for cherry, pear and plum in screen house of Fruit Research Institute, Čačak (a); establishment of aseptic culture – initiation of rozette: rootstock for cherry, Gisela 5 (b); for pear, Pyrodwarf (c); and for plum, Fereley Jaspi (d)

kratko traje, jer duže tretiranje deluje toksično na biljni materijal. Kod ove tri podloge dobro je izbalansirano vreme tretiranja eksplantata, kako poreklom iz laboratorijskih uslova, tako i iz mrežanika, jer je utvrđen veoma mali % potamnelih izdanaka (Tab. 1).

Formirane rozete po prenošenju na medijume za multplikaciju su se razvijale i multiplicirale, kako u prvoj supkulturi, tako i daljim supkultivisanjem.

Najbolji indeks multiplikacije u prvoj supkulturi dobijen je kod podloge Fereley Jaspi, a dužina osovin-skog i bočnih izdanaka, kod podloge Pyrodwarf, što se može tumačiti postojanjem genetijske, ili sortne specifičnosti koja postoji i u *in vitro* uslovima (Graf. 1).



Graf. 1. Parametri multiplikacije u prvoj supkulturi (prosek)
Multiplication parameters in the first subculture (average)
 IM – Indeks multiplikacije/*Multiplication index*
 LAS – Dužina osovin-skog izdanka/*Length of axial shoot*
 LLS – Dužina lateralnih izdanaka/*Length of lateral shoots*

Modifikovana metoda sterilizacije i načina uzimanja početnih eksplantata u ovom radu, koja je široko primenjena u laboratoriji za kulturu tkiva Instituta za voćarstvo i kod drugih vrsta voćaka, je verifikovana na Naučnom veću Instituta u kategoriji „Bitno poboljšan postojeći proizvod ili tehnologija; poboljšan tehnološki postupak“ i prikazana kao rezultat u izveštaju za 2008. godinu za projekat ev. br. 20013. – *Stvaranje i proučavanje novih genotipova voćaka i uvođenje savremenih biotehnologija gajenja i prerade voća.*

Regenerisani izdanci ovih podloga su daljim supkultivisanjem umnoženi i korišćeni za dalja *in vitro* is-

traživanja (Vujović et al., 2007; Ružić et al., 2008; Ružić et al., 2009 i dr.)

Zaključak

Vreme i način uzimanja početnih eksplantata su modifikovani u laboratoriji za kulturu tkiva Instituta za voćarstvo u Čačku.

Postavljanje grančica sa vegetativnim pupoljcima u periodu dubokog zimskog mirovanja u posudu sa vodom u laboratorijskim uslovima i veoma brzo otvaranje pupoljaka, omogućili su visok procenat inicijacije lisnih rozeta, kod tri aktuelne vegetativne podloge za trešnju, krušku i šljivu.

Osim tipa i načina uzimanja eksplantata na uspešnost uspostavljanja sterilne kulture uticala je i vremenski modifikovana metoda površinske sterilizacije.

Faza uspostavljanja aseptične kulture je, ne samo primena određenog protokola, već i iskustveni postupak, poseban i modifikovan u mnogim laboratorijama za mikropropagaciju, ali svaka inovacija predstavlja i veoma važan doprinos uspešnosti ove savremene metode razmnožavanja biljaka/voćaka i može imati širu primenu u komercijalnim laboratorijama.

Literatura

- Cossio F., Marino G., Rosati P. (1981): Multiplocazione *in vitro* del cilegio acido Vladimir. Rivista di Ortoflorofruitticoltura Italiana, 65: 285–292.
- Dradi G., Vito G., Standardi A. (1996): *In vitro* mass propagation of eleven *Prunus mahaleb* ecotypes. Acta Horticulturae, 410: 477–483.
- Gajdosova A., Ostrolucka M.G., Libiakova G., Ondruškova E., Šimula D. (2006): Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 14: 103–119.
- Grant N.J., Hammatt N. (1999): Increased root and shoot production during micropropagation of sweet cherry and apple rootstocks: effect of subculture frequency. Tree Physiology, 19, 3: 899–903.
- Hammerslag F. (1982): Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). J. Amer. Soc. Hort. Sci., 107: 44–47.
- Hartmann H., Kester D. (1983): Plant propagation – principles and practices. Prentice Hall INC., Engelwood Cliffs, New Jersey, pp. 545–568.
- Hepaksoy S. (2004): *In vitro* propagation of Maxma 14 sweet cherry rootstock. Anadolu, 14, 2: 67–80.
- Jones O.P., Hopgood M.E. (1979): The successful propagation *in vi-*

- tro* of two rootstock of *Prunus*: the plum rootstock Pixy (*P. insititia*) and the cherry rootstock F12/1 (*P. avium*). The Journal of Horticultural Science, 54: 63–66.
- Murashige T. (1974): Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology, 25: 135–136.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473–497.
- Osterc G., Luthar Z., Štampar F. (2004): The importance of the sterilization procedure for producing vigorous cherry plants (*Prunus* sp.) *in vitro*. Acta Agriculturae Slovenica, 83: 45–51.
- Rosati P., Marino G. (1980): Micropropagazione dei portainnesti degli alberi da frutto. Nota III. Micropropagazione di due cloni di susino portainnesti del pesco. XV Convegno di Peschiccolo, Ravenna, pp. 237–242.
- Ružić Đ., Rosati P., Marino G. (1984): Effetto dei fitoregolatori nella micropropagazione dell' ibrido pesco x mandorlo GF 677. Rivista della Ortoflorofruitticoltura Italiana, 5: 413–422.
- Ružić Đ., Cerović R. (1987): Radicazione di Colt micropropagato *in vitro* e *in vivo*. Rivista di Frutticoltura, 12: 73–75.
- Ružić Đ., 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: 9–14.
- Ružić Đ., 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 Đ., Cerović R. (2001): Rastenje i multiplikacija podloge za trešnju Gisele 5 *in vitro* u zavisnosti od mineralnog sastava medijuma. Jugoslovensko voćarstvo, 35, 133/134: 11–20.
- Ružić Đ., Cerović R. (2003): Primena *in vitro* metoda kod koštičavih vrsta voćaka. Jugoslovensko voćarstvo, 37, 141/142: 37–49.
- Ružić Đ., Sarić M., Cerović R., Čulafić Lj. (2003/4): Contents of macroelements and growth of sweet cherry rootstock *in vitro*. Biologia Plantarum, 47 (3): 463–465.
- Ružić Đ., Lazić T., Kuzmanović M. (2004): Razmnožavanje slabobujne podloge za krušku Pyrodwarf (*Pyrus communis* L.) mikropropagacijom *in vitro*. Zbornik naučnih radova sa XIX savetovanja o unapređenju proizvodnje voća i grožđa, Grocka, Vol. 10, 3: 60–68.
- 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 proizvodnju. Zbornik naučnih radova 2007., 13, 5: 47–53.
- Ružić Đ.V., Lazić T.I., Cerović R.M. (2008): Micropropagation of some *Prunus* and *Pyrus* genotypes *in vitro* as affected by different carbon sources. 5th International Cherry Symposium, Bursa (Turkey), Acta Horticulturae, 795: 413–418.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R., Kuzmanović M. (2009): The influence of imidazole fungicides on multiplication *in vitro* of low vigorous pear and cherry rootstocks. Proc. 1st IS on Biotechnol. of Fruit Species, Acta Horticulturae, 839: 79–86.
- Vujović T., Ružić Đ., Milenković S. (2007): Uvođenje nove podloge za šljivu, Fereley Jaspri, u proizvodnju sertifikiranog sadnog materijala metodom mikropropagacije *in vitro*. Voćarstvo, 41, 157/158: 71–77.
- Zuccherelli G. (1979): Metodologie nella moltiplicazione industriale *in vitro* dei portainnesti clonali del pesco pescomandorlo GF 677, susino GF 43, Damasco 1869, San Giuliano 655/2. Atti Inc. Sui Tecniche di coltura *in vitro*, Pistoia, pp. 147–154.

ESTABLISHMENT OF ASEPTIC CULTURE *IN VITRO* FOR NEW VEGETATIVE ROOTSTOCKS FOR CHERRY, PEAR AND PLUM**Đurđina Ružić, Radosav Cerović, Tatjana Vujović***Fruit Research Institute, 32000 Čačak, Kralja Petra I 9, Serbia**E-mail: jugvocca@yu1.net***Abstract**

Explant sterilization procedure, the initial phase of micropropagation, is very important for the successful organogenesis outcome, especially when initial explants are collected from open field (a planting) or glass house/screen house.

Standard procedure of surface sterilization, modified in terms of time, has been applied on Gisela, Pyrodward and Fereley Jaspi rootstocks. Two types of explants were used: buds taken from twigs maintained in laboratory, and from those maintained in a screen house.

The highest rate (%) of induced leaf rosettes was obtained from laboratory explants of Gisela 5 (82.7%). Besides type and method of taking explants, which are

major factors of successful establishment of sterile culture, the method of surface sterilization, modified in terms of time, has also proved a significant segment.

In the procedure of establishment of aseptic culture experience plays an important role. It varies among laboratories, as each micropropagation laboratory introduces new modifications. Nevertheless, any innovation represents a very important contribution to the success of this modern method of plant/fruit propagation which can be widely applied, particularly in commercial laboratories.

Key words: new fruit rootstocks, sterilization procedure, type of explants, initiation of leaf rosette