

IN VITRO RAZMNOŽAVANJE NOVIH VEGETATIVNIH PODLOGA ZA ŠLJIVU

Tatjana Vujović¹, Durđina Ružić¹, Tatjana Marjanović¹

Izvod: Vegetativne podloge za šljivu Docera, Dospina i St. Julien A su umnožavane *in vitro* pet uzastopnih supkultura na medijumu konstantnog sastava u cilju ispitivanja uticaja sukcesivnog supkultivisanja na parametre multiplikacije. Kod podloga Docera i Dospina uočeno je značajno povećanje indeksa multiplikacije i dužine osovinskih izdanaka u 3. supkulturi, posle čega njihova vrednost postepeno opada do 5. supkulture, ali i dalje ostaje značajno veća u odnosu na prve dve supkulture. Suprotno, kod podloge St. Julien A uočen je trend pada indeksa multiplikacije od 1. ka 3. supkulturi, posle čega njegova vrednost ponovo raste i ostaje na nivou 1. supkulture. Dužina osovinskih izdanaka se tokom supkultivisanja menjala na isti način kao kod podloga Docera i Dospina. Najveći kapacitet ožiljavanja *in vitro* utvrđen je kod podloge Docera (91,7%), a najniži kod St. Julien A (44,4%).

Ključne reči: Docera, Dospina, St. Julien A, *in vitro*, mikropropagacija

Uvod

Podloge za kalemljenje se tradicionalno razmnožavaju vegetativnim metodama (dugotrajan proces sa visokim udelom manuelnog rada), ili generativnim putem koji ne garantuje uniformnost sadnog materijala. Primena mikropropagacije u razmnožavanju podloga za kalemljenje započeta je 70-tih godina XX veka i u narednih 20 godina razvijen je veliki broj protokola za razmnožavanje podloga za različite sorte kontinentalnih vrsta voćaka (Vujović, 2012.).

Kod podloga za šljivu ova metoda je uspešno primenjena kod različitih klonova džanarike (*Prunus cerasifera* Ehrh.) kao što su podloge Mr.S serije (Fortuna i sar., 1996.), Myrobalan 29C (Shabani i sar., 2015.), Dzanka 4 (Nacheva i sar., 2002.), ali i vegetativnih podloga, Jaspi (Vujović i sar., 2012; Mahajan i sar., 2017.) i St. Julien A (Garoosi i sar., 2017.). Većina navedenih istraživanja je bila fokusirana na ispitivanje uticaja vrste i koncentracije biljnih regulatora raste (plant growth regulator – PGR) na multiplikaciju i ožiljavanje, dok je uticaj broja supkultura na regenerativnu sposobnost izdanaka *in vitro* znatno manje razmatran (Vujović i sar., 2012.). Generalno posmatrano, uticaj supkultivisanja na kapacitet za multiplikaciju *in vitro* značajno varira u zavisnosti od genotipa. Smanjenje indeksa multiplikacije tokom dugotrajnog gajenja i supkultivisanja na medijumima nepromenjenog PGR sastava uočeno je kod ananasa (Hamad i Taha, 2008.), ali i vegetativnih podloga za *Prunus*-e (Vujović i sar., 2012.). Međutim momenat pada kapaciteta za multiplikaciju značajno zavisi od uslova u kulturi *in vitro* (PGR sastav medijuma, dužine supkulture i dr.). Nasuprot ovome, Debnath (2004.) je kod maline (*Rubus pubescens* Raf.) uočio povećanje indeksa multiplikacije, dužine i broja listova tokom prve tri supkulture, posle čega se vrednost ovih parametara nije značajno menjala.

Polazeći od činjenice da je osnovna svrha mikropropagacije postizanje i održavanje visokih indeksa multiplikacije tokom *in vitro* gajenja, cilj ovih istraživanja je bio

¹Institut za voćarstvo, Kralja Petra I br. 9, Čačak, Srbija (tvujovic@institut-cacak.org).

utvrđivanje uticaja uzastopnog supkultivisanja na kapacitet za multiplikaciju različitih podloga za šljivu gajenih na medijumu konstantnog PGR sastava.

Materijal i metode rada

U eksperimentima su korišćene tri vegetativne podloge za šljivu. Docera 6 (*P. domestica* × *P. cerasifera*) i Dospina 235 (*P. domestica* × *P. spinosa*) pripadaju serijama podloga koje su stvorene kao rezultat oplemenjivačkog programa sprovedenog na Technische Universität München-Weihenstephan sa ciljem stvaranja podloga sa hipersenzitivnom rezistencijom na *Plum pox virus* (Neumüller i sar., 2013.). St. Julien A pripada trnošlji (*P. insititia*), odlikuje se srednjom bujnošću, dobrom kompatibilnošću ne samo sa šljivom već i sa breskvom, nektarinom i kajsijom. Veoma često je korišćena podloga u Evropi, naročito u Engleskoj i Nemačkoj.

Grančice odabranih podloga su uzimane sa stabala u polju u fazi početka vegetacije (kraj marta) i držane u laboratorijskim uslovima, na sobnoj temperaturi. Vegetativni pupoljci su skidani sa grančica počev od petog dana po unošenju u laboratorijske uslove pa u narednih sedam dana. Isprani su u protočnoj vodi (1,5–2 h), zatim u 70% etanolu (1'), 10% varikini (10') i 3 puta u sterilnoj vodi. Eksplantati veličine 0,3–0,8 cm su izolovani pod stereomikroskopom i postavljeni na MS medijumu (Murashige i Skoog, 1962.) sa 2 mg l⁻¹ N6-benzil-adenina (BA), 0,5 mg l⁻¹ indol-3-buterne kiseline (IBA) i 0,1 mg l⁻¹ giberelne kiseline (GA₃). Praćeni su sledeći parametri: procenat eksplantata koji je inicirao rozetu, kontaminiran i nekrotirao, i broj iniciranih lisnih rozeta po eksplantatu. U fazi multiplikacije, u svim supkulturama i za sve genotipove, korišćen je MS medijum sa BA 1, IBA 0,1 i GA₃ 0,1 mg l⁻¹, 30 g l⁻¹ saharoze i 7 g l⁻¹ agara, pH 5,7. Praćeni su sledeći parametri: indeks multiplikacije, dužina osovinskog i bočnih izdanaka. Supkultura je trajala 28 dana.

U fazi ožiljavanja je korišćen MS medijum sa mineralnim solima smanjenim na ½, 1 mg l⁻¹ IBA i 0,1 mg l⁻¹ GA₃. Supkultura je trajala 28 dana i praćeni su: procenat ožiljavanja, prosečan broj i dužina korenova i dužina ožiljenih biljaka.

Kulture su gajene u klimatizovanoj prostoriji sa kontrolisanom temperaturom (23 ± 1 °C), fotoperiodom (16/8 h, svetlost/mrak) i intenzitetom svetlosti (8,83 Wm⁻²).

Dobijeni rezultati su obrađeni statistički, analizom varijanse (ANOVA) i Dankanovim testom višestrukih intervala, za p < 0,05.

Rezultati istraživanja i diskusija

Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da upotrebljena procedura površinske sterilizacije nije dala zadovoljavajuće rezultate u odnosu na procenat kontaminiranih kultura koji se kretao u intervalu 40,0–58,6% (Tabela 1). Na visok procenat kontaminacije kod pupoljaka uzimanih sa biljaka iz polja je verovatno najveći uticaj imao jači intenzitet površinske kontaminacije biljnog materijala. Prema Hartman i Kester-u (1983.) matične biljke sa kojih se uzimaju početni eksplantati je potrebno držati u kontrolisanim uslovima staklare, sa maksimalno smanjenom vlažnošću vazduha, ili čak izbegavanjem zalivanja biljaka i do tri nedelje pre uzimanja eksplantata. Pored kontaminacije, uočen je i relativno visok procenat nekroze (20,0–35,2%), tako da je procenat eksplantata koji je formirao rozetu varirao u opsegu od 12,2% do 40,0%. Međutim, broj i kvalitet iniciranih lisnih rozeta bio je zadovoljavajući za sve genotipove (Tabela 1, Slika 1).

Tabela 1. Uspostavljanje aseptične kulture vegetativnih podloga za šljivu

Table 1. Establishment of aseptical culture of plum rootstocks

Genotip <i>Genotype</i>	Procenat kontaminacije	Procenat nekroze	Indukcija rozete <i>Rosette initiation</i>	Br. indukovanih rozeta
Docera	40,0 b	20,0 b	40,0 a	4,67 a
Dospina	45,9 b	35,2 a	18,9 b	2,00 c
St. Julien A	58,6 a	29,3 ab	12,2 b	3,00 b

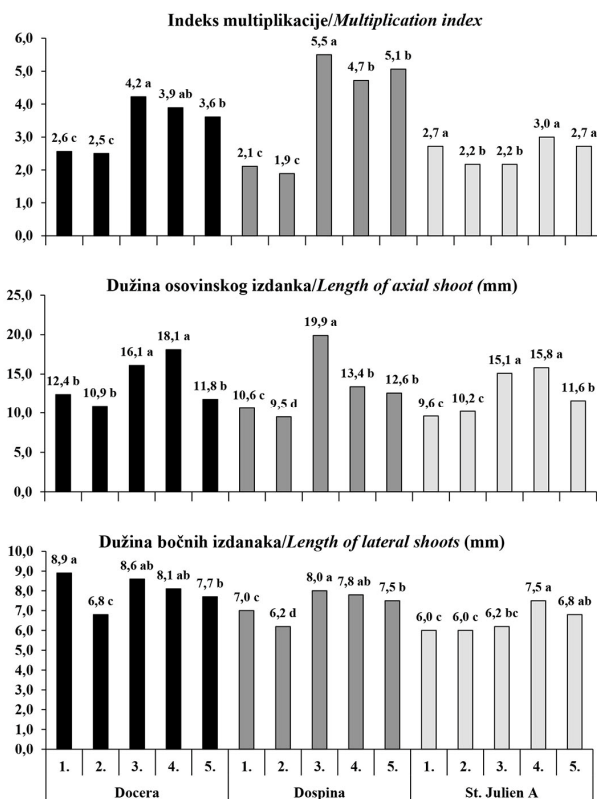


Slika 1. Inicijacija rozete: a) Docera; b) Dospina; c) St. Julien A

Figure 1. Rosette initiation: a) Docera; b) Dospina; c) St. Julien A

Posle uspostavljanja aseptične kulture izdanci ispitivanih podloga su tokom pet uzastopnih supkultura multiplicirani na medijumu konstantnog sastava. Na osnovu praćenja promene regenerativne sposobnosti izdanaka utvrđeno je značajno povećanje indeksa multiplikacije i dužine osovinskih izdanaka kod podloga Docera (4,2 i 18,1 mm) i Dospina (5,5 i 19,9 mm) u trećoj supkulturi, posle čega njihova vrednost postepeno opada do pete supkulture (3,6 i 11,8 mm – Docera; 5,1 i 12,6 mm – Dospina), ali i dalje ostaje značajno veća u odnosu na prve dve supkulture (Graf. 1). Norton i Norton (1986.) su ispitujući uticaj supkultivisanja na multiplikaciju kod 6 ukrasnih vrsta i sorata familije *Rosaceae* utvrdili da posle nekoliko prvih supkultura, tokom kojih je zabeležen rast, dolazi do postepenog smanjenja indeksa multiplikacije, ali i dužine izdanaka i veličine listova i to nezavisno od koncentracije BA u medijumu za multiplikaciju. Prema ovim autorima smanjenje indeksa multiplikacije može biti rezultat epigenetičkih promena koje nastaju kao odgovor na permanentno prisustvo i kumulativno nakupljanje biljnih regulatora rastanja (najverovatnije citokinina), kao i inhibitornog efekta rezidua koje nastaju njihovim metabolizmom, ili smanjene dostupnosti nekih mineralnih komponenata i saharoze u medijumu 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*. Suprotno, kod podloge St. Julien A uočen je trend pada indeksa multiplikacije od prve (2,7) ka trećoj supkulturi (2,2), posle čega njegova vrednost ponovo raste i ostaje na nivou prve supkulture (Graf. 1). Međutim, dužina osovinskih izdanaka se tokom supkultivisanja menjala na isti način kao kod podloga Docera i Dospina. Gubitak regenerativnog kapaciteta u prvim supkulturama za čak 50% je uočen i kod ananasa (Hamad i Taha, 2008.). Kod ovog genotipa je utvrđeno da je smanjenje indeksa multiplikacije tokom prve tri supkulture prevashodno determinisano dužinom i da se može 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.

Dužina bočnih izdanaka kod podloga Dospina i St. Julien A se takođe postepeno povećavala od prve ka petoj supkulturi, dok je kod podloge Docera uočeno smanjenje vrednosti ovog parametra sa supkultivisanjem (Graf. 1). Međutim tokom celog perioda umnožavanja *in vitro*, izdanci su bili normalne morfologije, dobro razvijenog habitusa i sa širokim, tamnozelenim listovima (Slika 2a-c).



Graf. 1. Uticaj supkultivisanja na parametre multiplikacije vegetativnih podloga za šljivu
 Graph. 1. Effect of subculturing on multiplication parameters of plum rootstocks

Tabela 2. Parametri ožiljavanja vegetativnih pologa za šljivu
 Table 2. Parameters of rooting in plum rootstocks

Genotip Genotype	Procenat ožiljavanja Rate of rooting (%)	Broj korenova No. of roots	Dužina korenova Root length (mm)	Dužina izdanaka Shoots height (mm)
Docera	91,7 a	3,9 a	12,3 b	12,9 ab
Dospina	51,9 b	2,4 b	11,4 b	16,0 a
St. Julien A	44,4 c	1,8 c	15,8 a	10,9 b

Kapacitet za ožiljavanje izdanaka *in vitro* zavisi od velikog broja faktora kao što su: starost eksplantata, dužina subkultivisanja, koncentracija i vrsta citokinina, odnos koncentracije citokinina/auksina u medijumu za multiplikaciju, kao i količina citokinina u tkivima usvojena tokom faze multiplikacije. U našim eksperimentima, uzimajući u obzir sve proučene parametre, najveći kapacitet za rizogenezu utvrđen je kod podloge Docera, a najniži kod podloge St. Julien A (Tabela 2, Slika 2 d-f). Stoga je kod podloge Dospina i St. Julien A potrebno izvršiti dodatnu optimizaciju ove faze testiranjem drugih vrsta auksina u cilju postizanja većih procenata ožiljavanja.



Slika 2. Izdanci vegetativnih podloga za šljivu u fazi multiplikacije i ožiljavanja: Docera (a, d); Dospina (b,e); St. Julien A (c, f)

Figure 2. Shoots of plum rootstocks in multiplication and rooting stages: Docera (a, d); Dospina (b,e); St. Julien A (c, f)

Zaključak

Prikazani protokol za razmnožavanje vegetativnih podloge za šljivu, uz neznatna usavršavanja faze multiplikacije i ožiljavanja, uvođenjem novih regulatora rastenja i/ili variranjem njihove koncentracije tokom supkultivisanja, može naći praktičnu primenu u komercijalnoj mikropropagaciji.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekata TR-31064 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS.

Literatura

- Debnath S.C. (2004). Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation. *Plant Growth Regulation*, 43, 179–186.
- Fortuna F., Citernes A.S., Morini S., Vitagliano C., Giovannetti M. (1996). Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphate fertilization on shoot apical growth of micropropagated apple and plum rootstocks. *Tree Physiology*, 16, 757–763.
- Garoosi G., Nezami E., Ostadsharif O. (2018). Effects of some anti-auxins on micropropagation and growth parameters and IAA-oxidase activity in Saint Julien A rootstock. *Journal of Plant Process and Function*, 6 (19), 303–310.
- Hartman H.T., Kester D.E. (1983). *Plant propagation, principles and practices*. Prentice-Hall INC, Engelwood Cliffs, New Jersey, USA, 545–552.
- 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.

- Mahajan S., Sharma N., Kaur R., Kumar S., Kumar K. (2017). *In vitro* propagation and analysis of genetic stability of *in vitro* propagated plants of Jaspí - A clonal rootstock of *Prunus*. *Advances in Research*, 12 (5), 1–12.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Nacheva L., Ivanova K., Manolov P., Zlatev Z. (2002). Possibilities for application of photoautotrophy in micropropagation of Dzhanka 4 (*Prunus cerasifera* Ehrh.) rootstock. *Acta Horticulturae*, 577, 199–205.
- Neumüller M., Mühlberger L., Siegler H., Hartmann W., Treutter D. (2013). New rootstocks with resistance to *Plum pox virus* for *Prunus domestica* and other stone fruit species: the ‘Docera’ and ‘Dospina’ rootstock series. *Acta Horticulturae*, 985, 155–165.
- 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.
- Shabani Z., Maghadam E.G., Abedi B., Tehranifar A. (2015). The effect of plant growth regulators and their concentration *in vitro* on mass propagation of Myrobalan 29C rootstock. *Journal of Horticulture and Forestry*, 7 (3), 57–64.
- Vujović T., Ružić Đ., 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.

IN VITRO PROPAGATION OF CONTEMPORARY VEGETATIVE ROOTSTOCKS FOR PLUM

Tatjana Vujović¹, Durđina Ružić¹, Tatjana Marjanović¹

Abstract

To determine the effect of successive subculturing on multiplication capacity of shoots, vegetative rootstocks for plum Docera, Dospina and St. Julien A were repeatedly subcultured for 5 subcultures on medium of unchanged composition. As for Docera and Dospina, significant increase in multiplication index and length of axial shoots was observed in the 3. subculture, whereupon their values gradually decreased to the 5. subculture, but remained considerably higher in comparison with the values in the first two subcultures. Contrary, in St. Julien A shoot multiplication declined over the first three subcultures, then increased and remained at the level of the 1. subculture. Length of axial shoots was changed in the same way as for Docera and Dospina. The highest capacity for *in vitro* rooting was observed in Docera (91.7%), while the lowest was in St. Julien A (44.4%).

Key words: Docera, Dospina, St. Julien A, *in vitro*, micropropagation

¹Fruit Research Institute, Kralja Petra I no. 9, Čačak, Serbia (tvujovic@institut-cacak.org).