

Organogeneza eksplantata vegetativne podloge Gisela 5R (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) u kulturi tkiva in vitro

Košutić, Karolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:789345>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-07**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Karolina Košutić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

**Organogeneza eksplantata vegetativne podloge Gisela 5
(*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) u kulturi tkiva *in vitro***

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Karolina Košutić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

**Organogeneza eksplantata vegetativne podloge Gisela 5
(*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) u kulturi tkiva *in vitro***

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. mag.ing.agr. Dejan Bošnjak, mentor
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, član
3. dr.sc. Monika Tkalec Kojić, član

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij, smjer Hortikultura

Završni rad

Organogeneza eksplantata vegetativne podloge Gisela 5 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) u kulturi tkiva *in vitro* Karolina Košutić

Sažetak: Nove tehnologije intenzivnog uzgoja trešanja oslanjanju se na nova znanstvena dostignuća u selekciji i oplemenjivanju podloga slabije bujnosti. Gisela 5 je najznačajnija slabo bujna podloga za trešnju u svijetu. Istraživanje je provedeno u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva u sklopu Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* laboratorij za voćarstvo) na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS) tijekom 2020. godine. Uspoređivan je učinak dvije vrste hranjive podloge (DKW i MS) na organogenezu dva tipa eksplantata (pojedinačni izdanci i baza izdanaka) vegetativne podloge za trešnju Gisela 5. Rezultati ukazuju na mogućnosti organogeneze oba tipa eksplantata na obje korištene hranjive podloge. DKW hranjiva podloga rezultirala je nešto boljim morfološkim parametrima na oba tipa eksplantata. Biljke nastale iz eksplantata baza izdanaka na obje hranjive podloge inicirale su veći broj i visinu izdanaka u odnosu na tretman s pojedinačnim izdancima. Daljnja istraživanja usmjeriti i na mogućnost sprječavanja nepoželjne vitifikacije i primijene drugih vrsta i koncentracija regulatora rasta (hormona).

Ključne riječi: trešnja, Gisela 5, mikropropagacija, organogeneza

25 stranica, 2 tablica, 16 grafikona i slika, 21 literaturni navod

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Horticulture

BSc Thesis

Organogenesis of vegetative rootstock Gisela 5 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) explants in tissue culture Karolina Košutić

Summary: New technologies of intensive cherry cultivation rely on new scientific achievements in the selection and breeding of low vigorous dwarf rootstock. Gisela 5 is the most important low vigorous cherry rootstock in the world. The whole experiment was carried out on *in vitro* laboratory for fruit growing, Faculty of Agrobiotechnical Science Osijek during 2020 year. The organogenesis of two types of explants (individual shoots and base of shoots) on the vegetative rootstock of sweet cherry Gisela 5 initiated on two types of nutrient medium (DKW and MS) was compared. The results indicate the possibility of organogenesis both types of explants in both used culture media. DKW nutrient medium resulted in slightly better morphological parameters on both types of explants. Microplants formed from explants base of shoots on both nutrient media initiated a higher number and height of shoots compared to treatment with individual shoots. Further research focused on the possibility of preventing undesirable vitrification and the use of other types and concentrations of plants growth regulators (hormones).

Keywords: sweet chery, Gisela 5, micropropagation, organogenesis

25 pages, 2 tables, 16 figures, 21 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Intenzivna proizvodnja trešnje u RH	1
1.2. Podloge za trešnju	2
1.3. Gisela 5 – povijest i karakteristike.....	4
1.4. Mikropropagacija – kultura tkiva.....	8
1.4.1. Nulta faza: Postupci prije kulture.....	12
1.4.2. Faza 1: uvođenje u kulturu (uspostavljanje aseptične kulture).....	12
1.4.3. Faza 2: Umnožavanje ili reprodukcija (multiplikacija).....	12
1.4.4. Faza 3: Priprema kultura za prijenos biljčica u zemlju (rizogeneza).....	13
1.4.5. Faza 4: Prijenos biljčica u zemlju (ex vitro - aklimatizacija).....	13
2. MATERIJAL I METODE	14
3. REZULTATI I RASPRAVA	18
3.1. Razlike između podloga u organogenezi eksplantata Gisela 5.....	18
3.2. Razlike između tipa eksplantata u organogenezi Gisela 5.....	20
3.3. Učinkovitost primijenjenih tretmana u organogenezi eksplantata Gisela 5	21
4. ZAKLJUČAK	23
5. POPIS LITERATURE	24

1. UVOD

1.1. Intenzivna proizvodnja trešnje u RH

Zahvaljujući novim znanstvenim dostignućima u selekciji podloga i sorti i uvođenju novih tehnologija u uzgoju na osnovi stručnog iskustva općenito, a posebno s novim sustavima uzgoja i primjenom prikladnih uzgojnih oblika, u svijetu uzgoj trešanja poprima sve veće značenje. Taj trend slijede hrvatski voćari. Nakon dugog stagniranja, pa i nazadovanja u uzgoju i proizvodnji trešanja, ova kultura doživljava pravu renesansu gdje iole postoje povoljni ekološki uvjeti. No, nemamo dovoljno iskustva s novim podlogama, sortama i sustavima uzgoja, pa se često i griješi kod podizanja novih trešnjika, bilo pri izboru: podloga, sorti, uzgojnih oblika i gustoće sklopa. Još je manje iskustva s utvrđivanjem optimalnog roka berbe i postupcima s plodovima od proizvođača do potrošača, uključujući i postupke oko čuvanja plodova. Ovisno o klimatskim prilikama proizvodnog područja vrijeme zrenja pojedine sorte može osjetno varirati. Stoga se vrijeme zrenja trešanja razvrstava po tjednima zrenja, dakle u širem rasponu unutar istog klimata. Da se bolje osvijetli pitanje vremena zrenja, odnosno roka berbe prakticira se uspoređivati zrenje pojedine sorte u odnosu na vrijeme zrenja sorte Burlat. U SAD-u se vrijeme berbe uspoređuje u odnosu na zrenje sorte Bing. U Hrvatskoj bi trebalo utvrditi vrijeme zrenja pojedinih sorti u odnosu na klimatske prilike, odnosno lokalnu klimu. Uvođenje novih tehnologija osigurava bolji uspjeh u uzgoju i ekonomsku učinkovitost. Dok nemamo dovoljno domaćeg iskustva potrebno je koristiti transfer znanja iz strane prakse, a posebno onih voćarskih zemalja koje su posljednjih 15 do 20 godina osjetno unaprijedili i proširili proizvodnju (Miljković, 2011.).

Kultura trešnje u Hrvatskoj ima dugu i slavnu tradiciju. Trešnja se uzgaja manje ili više na području čitave Hrvatske. Uzgoj je nešto više proširen u mediteranskom području. Glavni centri uzgoja trešanja u mediteranskom području su: Konavle, Pelješac (Ston), Poljica (Tugari), Kaštela, Ravni kotari oko Benkovca i Zadra, otok Cres, Kastav, Lovran i zapadna obala Istre, gdje plodovi općenito, a posebice ranih sorti ranije dozriju, pa postižu dobar plasman na tržištu. U kontinentalnom dijelu Hrvatske trešnja se više uzgaja uz veće gradove, odnosno potrošačke centre: okolica Zagreba, (Okić, Plješivica, Prigorje), Črešnjevo kraj Varaždina, gornje Međimurje, Kutjevo, okolica: Našica, Slavonskog Broda, Osijeka, Vinkovaca, Vukovara i

Iloka. Na području Banovine, Korduna i Like trešnja se sporadično uzgaja u obliku solitera, tj. pojedinačnih stabala. Trešnja na Kordunu uz granicu sa Bosnom i Hercegovinom i na području Like kasnije počinje vegetaciju pa joj plodovi kasnije dozrijevaju, odnosno dozrijevaju u vrijeme kad je ponuda na domaćim tržištima praktično završena i kada je potražnja velika, a posebno u vrijeme turističke sezone od lipnja do početka kolovoza. Iskustvo je pokazalo da vrlo rane i kasne sorte postižu najbolje ekonomske učinke, odnosno plodovi postižu veće prodajne cijene. Dok mediteransko područje ima komparativnu prednost pred kontinentalnim područjem u proizvodnji ranih sorti dotle kontinentalno područje treba više prakticirati uzgoj sorti srednjeg i kasnijeg dozrijevanja. Uzgoj trešanja u čitavoj Hrvatskoj je uglavnom ekstenzivan u obliku pojedinačnih stabala u kućnim vrtovima, ili vinogradima, gdje trešnja prati vinovu lozu. Malo je suvremenih voćnjaka. Uzgoj trešanja proširen je u privatnim voćnjacima (Miljković, 2011.).

U Hrvatskoj danas imamo svega oko 800.000 stabala trešanja, koje se uzgajaju na ukupno oko 4000 ha, odnosno na površini do koje se dolazi na osnovi proračuna kada se uzme da su trešnje sađene na bujnoj podlozi divlje trešnje ili rašeljke na veliki razmak. Proizvodnja je posve nedostatna jer se po stanovniku troši ukupno oko 3 kg trešanja i to kako u svježem stanju tako i u obliku različitih prerađevina. Sve do nedavno trešnja se uzgajala na generativnim podlogama i to u kontinentalnom dijelu uglavnom na divljoj trešnji vrapčari (*Prunus avim* L.), a manje samo na dobro dreniranim tlima na sjemenjacima rašeljke (*Prunus mahaleb* Mill.), a u obalnom dijelu najviše na podlozi rašeljke (*Prunus mahaleb* Mill.), a malo na sjemenjacima vrapčare (*Prunus avim* L.). Prevladavale su stranooplodne sorte sitnijeg ploda. Od ranih sorti uzgajane su Rana iz Marka, Kasinova rana i Lionska rana. Od ostalih sorti bile su zastupljene autohtone hrvatske sorte: Tugarka, Gomilička rana, Stonska kratke peteljke, Stonska duge peteljke, Kutjevačka i Okićka, a od stranih Hedelfinška, Germesdorfska, Badačanka, Schneiderova, Drozanova, Dönlisenova, Napoleon, nešto kasnije Van, Bing, Lambert i Stella (Miljković, 2011.).

1.2. Podloge za trešnju

Nove tehnologije intenzivnog uzgoja trešanja oslanjanju se, prije svega na nova znanstvena dostignuća u selekciji i oplemenjivanju podloga općenito, a posebice, slabije bujnosti, i novih samooplodnih gospodarski vrijednih sorata s većim plodovima bolje kakvoće. Uz to se selekcija

oslanja na dobivanje sorti prikladnih za strojnu berbu, a da pri tome na mjestu odvajanja peteljke od ploda u receptakulu ne uslijedi izljev soka nego da plod ostane zatvoren sa odvajajućim plutastim stanicama, koje na taj način štite plod od kvarenja, odnosno napada gljivica – plijesni. Uz to se u uzgoju primjenjuju novi sustavi s uzgojnim oblicima prikladnim za gušći sklop, bržu, lakšu i jeftiniju berbu, kako bi se postigla veća proizvodnost rada, odnosno veći učinak pri berbi koja participira s oko 65-70 % od ukupnih troškova proizvodnje. Od novih sustava uzgoja trešanja u gustom sklopu posebice se ističu: vitko vreteno, “španjolska vaza”, “kandelabr” i Tatura trellis (Miljković, 2011.).

Posljednjih 15 godina učinjeni su veliki pomaci u selekciji i istraživanju prikladnosti podloga za trešnju. Osnovni sadržaj tih istraživanja je slijedeći:

- Selekcija slabije i slabo bujnih podloga koje imaju dobar afinitet, odnosno podloga koje odražavaju utjecaj na bujnost sorata, koje se uzgajaju cijepljene na njima
- Selekcija podloga koje imaju dobar afinitet, odnosno koje su potpuno ili dovoljno kompatibilne sa svima sortama
- Selekcija podloga koje su adaptivne na različite edafske prilike, a posebice na teksturu, količinu karbonata, reakciju tla i otporne spram asfiksija korijenove mreže, zatim prema niskim temperaturama i suši
- Selekcija podloga koje su malo osjetljive prema parazitima: *Phytophthora*, *Armillaria*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Verticillum*, nematode: *Melodogyne javanica* i *Melodogyne incognita*
- Selekcija podloga koje se lagano razmnožavaju vegetativno i generativno
- Selekcija podloga koje razvijaju snažne korijenove mreže s ravnomjernim rasporedom korijenja u dubinskom i lateralnom smjeru, tj. imaju simetrične korijenove mreže, koje dobro učvršćuju voćku u tlu
- Selekciju podloga koje ne razvijaju korijenove izdanke

Na selekciji i istraživanju novih podloga za trešnju najviše se radilo u: Belgiji (Inmil GM9, Damil GM61, Camil GM19), Njemačkoj (Gisela, Weiroot 10, Weiroot 53, Weiroot 72, Weiroot 158, Pi-Ku 4.20, Pi-Ku 4.22, Pi-Ku 4.83), Italiji (CAB 6P, CAB 11E, CAB 4D, CAB 8H, Real, Victor), SAD-u (MaxMa / MM i OCR klonovi), Rumunjskoj, Francuskoj (Avima-Argot, GF

64, Edabriz, Pontaleb-Ferci) Češkoj (P-HL A, P-HL B, P-HL C) i Španjolskoj (MM 9, MMP 12, Pietas No 1, Adara,).

Od ostalih zemalja treba spomenuti Veliku Britaniju u kojoj je selekcionirana podloga Colt u Pokusnoj stanici u East Mallingu, zatim Dansku gdje su selekcionirane podloge Dan 1 i Dan 2. Rad na selekciji podloga nastavlja se intenzivno i u drugim zemljama, ali još ne raspolažemo sa pouzdanim informacijama o njihovoj biološkoj i gospodarskoj vrijednosti.

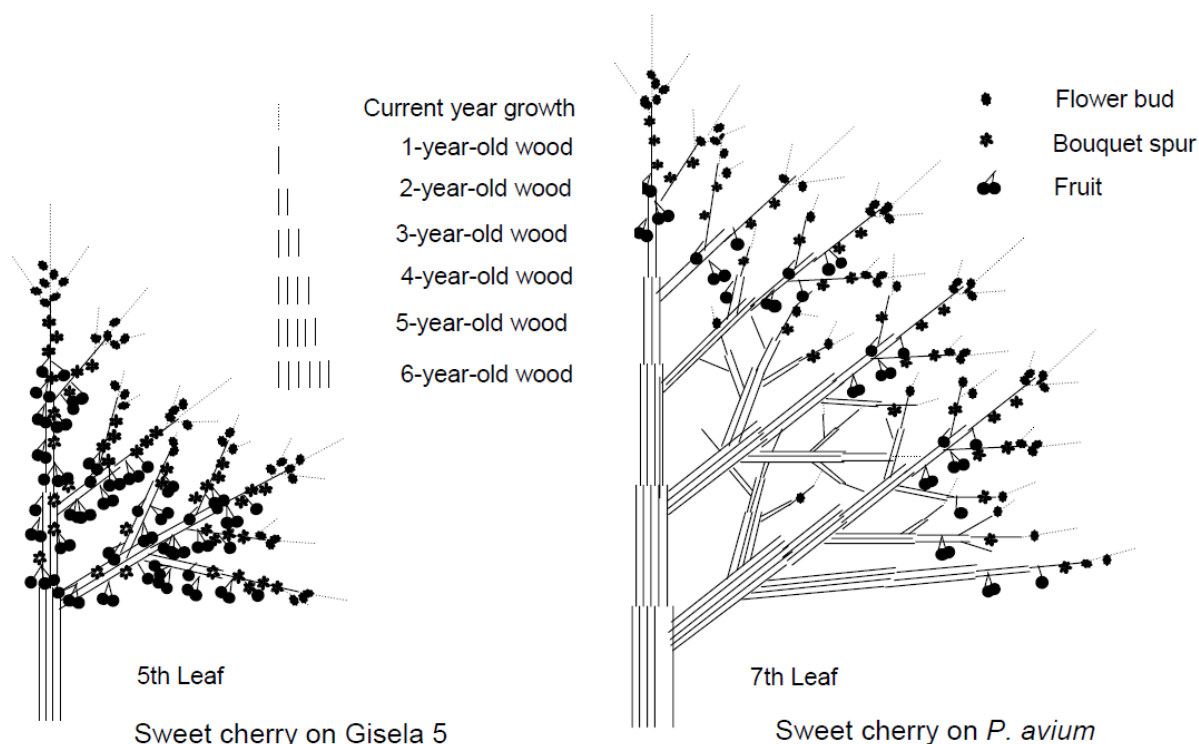
U našoj zemlji još nisu provedena sustavna istraživanja o prikladnosti novih podloga, pa nemamo vlastitih rezultata. Prva introdukcija novih podloga obavljena je na Centru za uzgoj trešanja u Kaštelama. Druga introdukcija novih podloga obavljena je u Hrvatskoj prije 13 godina. Tom je prilikom uvezeno 10 novih podloga koje su posađene u pokusni trešnjik na Fakultetskom pokusnom i nastavnom dobru Jazbina kraj Zagreba (Miljković, 2011.).

Na temelju iskustva stečenog u Italiji danas se od podloga kao prikladne preporučuju: CAB 6P, Colt, Sjemenjak vrapčare (*Prunus avium L.*), MaxMa Delbard 14 Brokforest, Sjemenjak rašeljke (*Prunus mahaleb Mill.*) i SL 64. Odbačene su podloge: Camil GM 79, Damil GM 61/1, Gisela 1 (klon 172/9), Gisela 4 (klon 473/10), Gisela 10 (klon 473/10), Mazzard F 12/1, Tabel-Edabriz, Weiroot 53, Weiroot 72. Od podloga koje obećavaju ističemo: Gisela 5 (klon 148/2), Gisela 6 (klon 148/1), Gisela 7 (klon 148/8), Gisela 12 (klon 195/2), MaxMa Delbard 97 Brokgrave, Pi-Ku 1 (klon 4,20) i Victor. Među interesantnim podlogama koje još nisu dovoljno istražene spominju se: Adara, MaxMa Delbard 60 Broksec, Pontaleb-Ferci SL 405, Serie PH-L A, P-HL B, P-HL C, a također i serije Pi-Ku 2, Pi-Ku 3 i Pi-Ku 4, dok se od njemačkih Weiroot podloga predlaže podloga Weiroot 158 (Miljković, 2011.).

1.3. Gisela 5 – povijest i karakteristike

Serijska podloga Gisela nastala je u Njemačkoj na univerzitetu Justus Liebig u mjestu Giessen putem međuvrsne hibridizacije između vrsta *P. avium*, *P. cerasus*, *P. fruticosa* i *P. canescens*. Selekcioniari su W. Gruppe i H. Schmidt. Ove podloge su patentirane, a nosilac licence je Consortium Deutscher Baumschulen GmbH. Podloge serije Gisela se razmnožavaju zelenim reznicama ili mikropropagacijom (Milatović i sur., 2015.). One su različite bujnosti, a prevladavaju slabo bujne i srednje bujne podloge. Ove podloge utječu na povećanje

generativnog potencijala sorti trešnje, koji se ogleda u povećanju broja: majskih buketića po jedinici dužine grane, cvjetnih pupoljaka na majskom buketiću, kao i cvjetova u cvati. Manja bujnost, kao i veći generativni potencijal utječu i na višestruko povećanje specifičnog prinosa po jedinici površine poprečnog presjeka debla u odnosu na standardne podloge (Ystaas i Froynes, 1996.; Walter i Franken-Bembenek, 1998.). Sorte cijepljenje na ovim podlogama dostižu 20 - 90% bujnosti u odnosu na divlju trešnju. Cijepljene sorte rano dolaze u rod, obično u drugoj ili trećoj godini nakon sadnje.

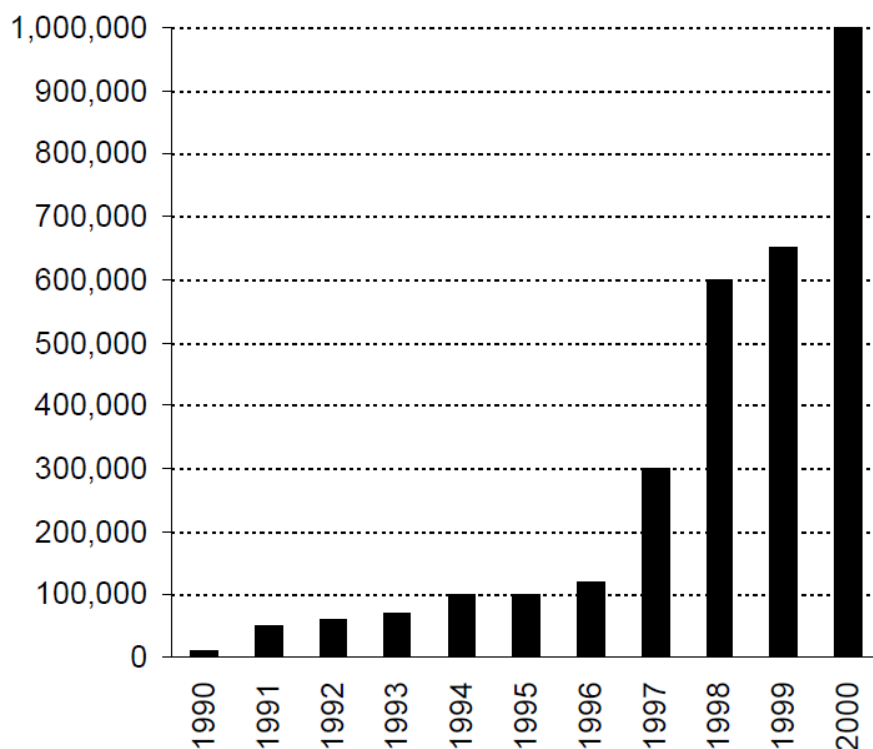


Slika 1. Shematski prikaz usporedbe plodonošenja na podlozi Gisela 5 i *P. avium* (bez lišća), (Izvor: Franken-Bembenek, 2005.)

Od većeg broja podloga serije Gisela, najviše su rasprostranjene podloge Gisela 5 i Gisela 6, koje će biti detaljnije opisane. Pored njih, značajne su i podloge Gisela 1, 3, 4, 7, 10 i 12.

Gisela 5 (148/2). Ova podloga je triploidan hibrid dobiven križanjem *P. cerasus* (sorta Krupna lotova) x *P. canescens*. U proizvodnji je od 1994. godine. Posljednjih godina se naglo širi i postala je najpopularnija slabo bujna podloga za trešnju u svijetu. Godišnja proizvodnja sadnica trešnje u svijetu (bez Sjeverne i Južne Amerike) na ovoj podlozi je povećana sa 10.000 sadnica

u 1990. godini na više od milijun sadnica u 2000. godini. U Njemačkoj je najviše korištena podloga, sa sudjelovanjem oko 50% u novim nasadima trešnje (Franken-Bembenek, 2005.).



Grafikon 1. Trend rasadničke proizvodnje podloge Gisela 5,
(Izvor: Franken-Bembenek, 2005.)

Ima srednja rizogena svojstva. Razmnožava se mikropropagacijom. Traži plodnija tla. Ne podnosi teška, glinovita tla. Osjetljiva je na sušu. Navodnjavanje je obavezno u područjima sa manje od 450 mm oborina, a preporučuje se u svim regijama uzgajanja (Franken-Bembenek, 2005.). Umjereno je osjetljiva na veći sadržaj vapna u tlu. Otporna je na zimske mrazeve. Osjetljiva je na *Pseudomonas spp.*, *Phytophthora spp.* i *Armillaria mellea*, a malo osjetljiva na *Agrobacterium tumefaciens* i *Blumeriella jaapii*. Ukorjenjivanje je osrednje, pa se preporučuje korištenje naslona, posebno na lakšim, pjeskovitim tlima i u vjetrovitim područjima. Nije sklona formiranju izdanaka.

Ima dobar afinitet sa većinom sorti trešnje. Slabo je bujna podloga. Sorte cijepljene na njoj dostižu 20-40 % bujnosti u odnosu na mladicu divlje trešnje. Pogodna je za gustu sadnju, sa

1.000-1.500 stabala po ha. Potiče formiranje razvedene krošnje, sa većim kutom grananja. Cijepljene sorte prorode u drugoj godini po sađenju, a punu rodnost dostižu u petoj godini. Rodnost sorti na ovoj podlozi je vrlo visoka u prvim godinama nakon sađenja. Specifičan prinos po jedinici površine poprečnog presjeka debla često je nekoliko puta veći nego na standardnim podlogama, kao što su F 12/1 ili mladica divlje trešnje (Franken-Bembenek, 1998.; Sitarek i sur., 2005.). Međutim, u kasnijim godinama rodnost sorti na ovoj podlozi često značajno opada (Lichev i Papachatzis, 2009.). Kao posljedica visoke rodnosti u periodu početne rodnosti može doći do slabljenja vegetativnog potencijala, koji se očituje u vrlo slabom porastu mladica. Uslijed manje lisne površine dolazi i do smanjenja krupnoće plodova. To je naročito izraženo kod samooplodnih sorti trešnje. U cilju sprječavanja ove pojave preporučuju se sljedeće mjere: jača rezidba, dodavanje većih količina dušičnog gnojiva, navodnjavanje i prorjeđivanje cvjetova i plodova (Andersen i sur., 1999.).

Zbog manjih dimenzija, stabla trešnje na ovoj podlozi su više izložena mrazovima koji su najjači pri površini tla. Smrzavanje cvjetnih pupoljaka kod sorti cijepljenih na ovoj podlozi se može javiti i na temperaturama višim od -20°C (Lichev i Papachatzis, 2006.; Milatović i sur., 2011.). Pored toga, sorte trešnje cijepljene na ovoj podlozi cvjetaju nekoliko dana ranije u odnosu na mladice divlje trešnje, što povećava njihovu osjetljivost na kasne proljetne mrazeve.

Treba istaknuti da podloga Gisela 5 ne daje dobre rezultate u svim klimatima i uvjetima tla. Nasuprot nizu pozitivnih rezultata dobivenih sa ovom podlogom u mnogim zemljama, susreću se i negativni rezultati. Tako je u uvjetima južne i središnje Italije kod sorte Lapins cijepljene na ovoj podlozi utvrđeno veliko propadanje stabala, slab prinos i mala krupnoća ploda (De Salvador i sur., 2005.; Palasciano i sur., 2008.). Ova podloga bolje rezultate daje u područjima sa prohladnom klimom ili na nešto većim nadmorskim visinama (Lugli i Bassi, 2010.). ne podnosi previše toplu klimu i visoke temperature u toku ljeta.

Gisela 5 je najznačajnija slabo bujna podloga za trešnju u svijetu. Dobre osobine ove podloge su što sorte cijepljene na njoj imaju malu bujnost, rano prorode i vrlo dobro rode. Međutim, za postizanje dobrih rezultata u proizvodnji potrebno je da su u nasadu primjene odgovarajuće agrotehničke i pomotehničke mjere, kao što su navodnjavanje, jače gnojenje, jača i redovna rezidba.

1.4. Mikropropagacija – kultura tkiva

Biljke se razmnožavaju na dva načina: generativno (spolno) s pomoću sjemenki i vegetativno (nespolno) s pomoću vegetativnih dijelova biljke (reznica, lukovica, gomolja i sl.). Vegetativno razmnožavanje nazivamo još klonско razmnožavanje. U određenim uvjetima oba načina mogu biti otežana. Kada spolno razmnožavanje nije moguće (sjeme se ne stvara ili se stvara u premaloj količini ili pak prebrzo gubi vijabilnost), može se primijeniti vegetativno razmnožavanje.

Vegetativno razmnožavanje *in vivo* (reznicama, vriježama, odvajanjem komadića biljke, povaljenicama, lukovicama i dr.) primjenjuje se u poljoprivredi već vrlo dugo i ima podjednako važnu ulogu kao i razmnožavanje sjemenkama; mnoge važne kulture kao krumpir, jagode, vinova loza, mnoge lukovičaste kulture, drvenaste voćke, cvjetne kulture i dr. razmnožavaju se isključivo vegetativno.

Osim za reprodukciju, vegetativno je razmnožavanje važno i u oplemenjivanju: stabilne su roditeljske linije potrebne (što se postiže vegetativnim razmnožavanjem) za trajnu proizvodnju sjemena. Kloniranje je važno i ako se želi osnovati banka gena. Za dobivanje solidnih mutanata nakon izvedene mutacije potrebno je stvaranje adventivnih izdanaka.

Klasične metode vegetativnog razmnožavanja, međutim, nisu široko primjenjive, a često ih nije moguće ostvariti zbog brojnih poteškoća i nedostataka, kao što su sporost i teškoće u provedbi, previsoka cijena provedbe ili nemogućnost vegetativnog razmnožavanja biljaka.

Posljednjih godina, nakon što se pokazalo da se znatno veći broj biljnih vrsta može (i to mnogo brže i uspješnije) klonirati *in vitro* nego *in vivo*, znanje koje se steklo istraživanjem razmnožavanja *in vitro* brzo se nagomilalo: podjednako za biljke umjerenih područja, subtropskih i tropskih, zeljastih vrsta i drvenastih trajnica. Danas je u uvjetima *in vitro* moguće klonirati i one vrste koje do sada klasičnim metodama nikako nije bilo moguće (Sibila, 1994.).

Od postojećih tehnika kulture biljnoga tkiva i stanica, kloniranje biljaka postiglo je do danas najširu primjenu.

Danas se mikropropagaciji mnogih biljnih vrsta daje prednost u odnosu na klasično vegetativno razmnožavanje, i to zbog ovih činjenica:

- a) Razmnožavanje *in vitro* mnogo je brže od razmnožavanja *in vivo*.

- b) Moguće je razmnožavati i one biljke koje u uvjetima *in vivo* nije moguće.
- c) Mikroklonirane biljke često rastu bolje i snažnije od biljaka kloniranih *in vivo*.
- d) U kulturi *in vitro* razmnožavaju se samo zdrave biljke, bilo da je to združeno sa strogom selekcijom početnog materijala bilo pak da biljke ozdravljaju primjenom kulture *in vitro*. Tehnologija *in vitro* također omogućava prijenos biljaka na veće (međunarodne) udaljenosti.
- e) Budući da je za postavljanje kulture *in vitro* obično potrebno vrlo malo početnog materijala, vegetativno razmnožavanje može započeti s vrlo odabranim i posebnim materijalom.
- f) Razmnožavanje *in vitro* može uštedjeti znatna sredstva koja se inače troše za grijanje staklenika, prostora itd. Prostor potreban za podizanje i razmnožavanje matičnih biljaka znatno se smanjuje upotrebom kulture *in vitro*.
- g) Zahvaljujući optimalnim uvjetima (hranidbena podloga i fizički faktori) omogućeno je precizno vremensko planiranje proizvodnje presadnica, čime se poništava sezonski utjecaj i postiže proizvodnja kroz čitavu godinu.
- h) Razmnožavanje *in vitro* omogućava ukorjenjivanje reznica pa je cijepljenje pupova na podloge nepotrebno (time se štedi vrijeme i izbjegavaju problemi inkompatibilnosti).
- i) Za profesionalne proizvođače kultura *in vitro* ima još ove, dodatne prednosti:
 1. Nove sorte mogu se komercijalno brzo razmnožiti i tako ponuditi tržištu u mnogo kraćem vremenu
 2. Mogu se brže postaviti mali roditeljski klonovi za stvaranje F_1 – hibrida
 3. Oplemenjivači mogu brže postići solidne mutante utjecajem adventivnih pupova i izdanaka
 4. Kultura *in vitro* posebno je korisna za osnivanje banke gena koja čuva zdrav, od virusa slobodni biljni materijal, na niskoj temperaturi i malom prostoru
 5. Neke biljke potrebno je ustaliti i razmnožavati vegetativno jer su spolno sterilne (haploidi, sterilne mutante, linije koje nose citoplazmatsku mušku sterilnost), a potrebne su u stvaranju križanaca, također i rijetki aneuploidi ili biljke s neobičnim kromosomskim kombinacijama koje bi se mogle izgubiti ako se razmnože sjemenom, kao i posebne heterozigotne genske kombinacije (Dale i Webb, 1985).

Treba navesti i nedostatke koje može imati ova tehnologija:

- a) Genetička stabilnost u nekim je sustavima razmnožavanja *in vitro* vrlo niska (umnožavanje adventivnim izdancima i somatskim embrijima u kalusnim kulturama).
- b) Biljke iz kulture mogu, nakon prijenosa u uvjete *in vivo*, pokazivati određene loše značajke kao npr. grmoliki rast (nastavlja se stvaranje postraničnih ogranaka) ili potpuni povrat na juvenilne karakteristike.
- c) Kod drvenastih vrsta često je vrlo teško potaknuti ukorjenjivanje reznica *in vitro* (isto kao i s klasičnim reznicama). Kod nekih biljaka korijenje zametnuto *in vitro* nije funkcionalno u uvjetima *in vivo* i mora biti zamijenjeno novim korijenjem koje je prilagođeno supstratu.
- d) Prijenos biljaka iz uvjeta *in vitro* u uvjete *in vivo* kod nekih je vrsta posebno zahtjevan i težak.
- e) Mikroklonirani genotip biljaka, koji će se na kraju uzgajati u polju na otvorenome, može biti osjetljiv na bolest i uništen od patogenog organizma koji ga je napao. Za zaštitu biljaka provedenih *in vitro* mogu se (katkada i moraju) primijeniti intenzivne zaštitne mjere.
- f) Regenerativna sposobnost može se izgubiti nakon određenog broja supkultura kalusnog tkiva ili stanica.
- g) U nekim slučajevima sterilna je izolacija eksplantata neobično teška.
- h) Jedna od značajki kloniranja *in vitro* opsežan je rad koji uvjetuje relativno visoku cijenu nastalih biljaka *in vitro* (Smith, 1986).

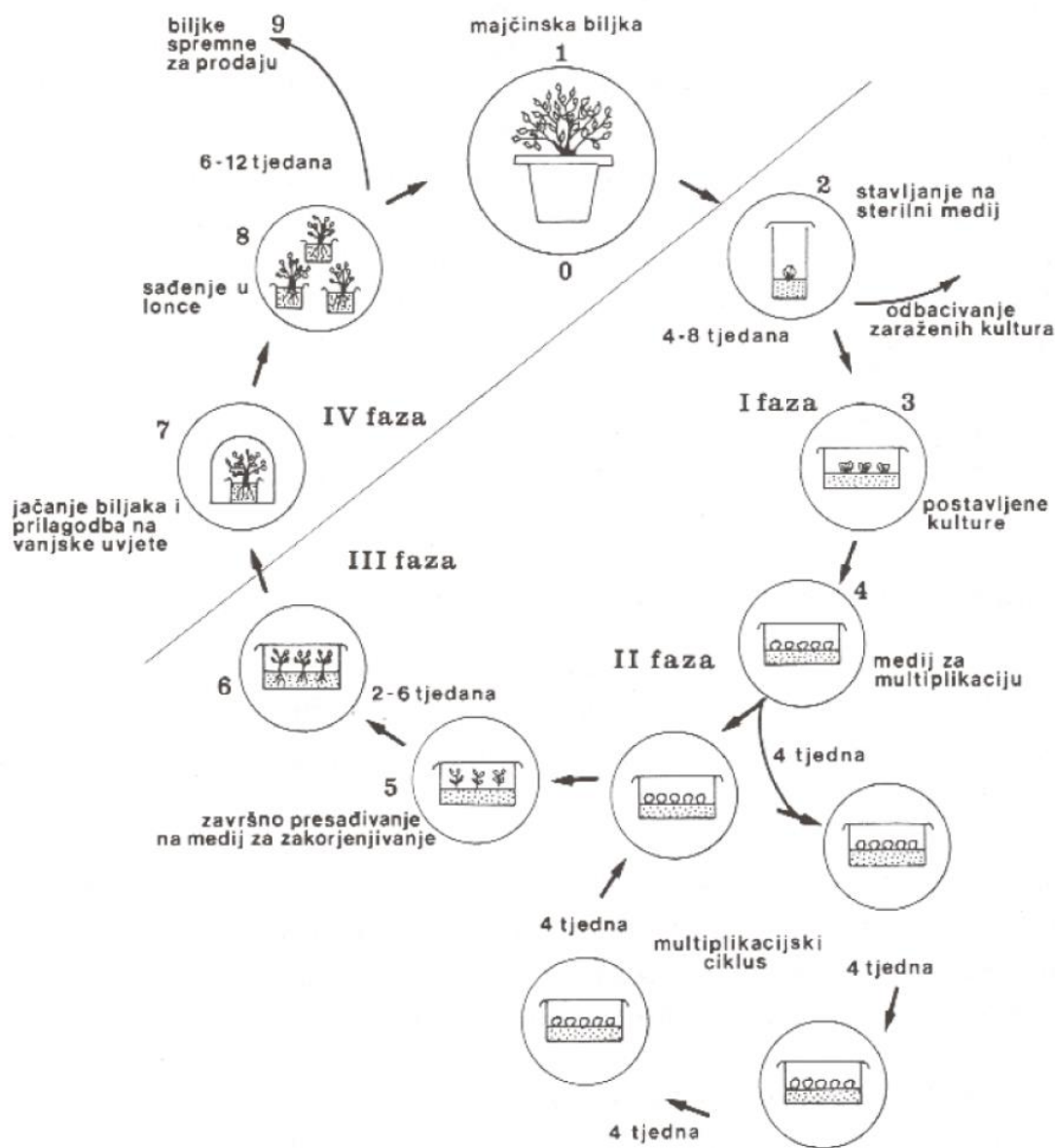
Presadnice (propagule) u uvjetima *in vitro* mogu se stvarati na tri načina: a) poticajem rasta aksilarnih pupova, b) stvaranjem adventivnih izdanaka i c) somatskom embriogenezom. Svaka od ovih triju metoda ima svoje prednosti i nedostatke.

Metode za kloniranje biljaka *in vitro* jesu: pojedinačni nodijalni segmenti (reznice), aksilarno grananje i regeneracija adventivnih organa (korijenja i izdanaka) na eksplantatima.

Nakon što smo naveli prednosti i nedostatke vegetativnog razmnožavanja *in vitro* možemo još istaknuti kriterije koji su poželjni i koji omogućavaju sigurno klonsko razmnožavanje. To su

genska stabilnost, stroga selekcija zdravog početnog materijala, relativna lakoća prijenosa biljaka iz uvjeta *in vitro* (epruvete) u vanjske uvjete, trajni regeneracijski potencijal i na kraju, postupak razmnožavanja ne smije biti previše kompliciran, a biljke ovako proizvedene, moraju se ekonomski isplatiti.

Postupak vegetativnog razmnožavanja može se raščlaniti na više faza (Murashige, 1974; Debergh i Maene, 1981) ili drugim riječima, da se sastoji od nekoliko međusobno različitih postupaka (Slika 2. i 3.).



Slika 2. Shematski prikaz pojedinih faza u mikropropagaciji *in vitro*, (Izvor: Sibila, 1994.)

1.4.1. Nulta faza: Postupci prije kulture

Ova faza uključuje sve postupke prije početka kulture *in vitro*: pravilan postupak s početnim materijalom, njegovo čuvanje u zdravu stanju (staklenik bez kukaca, čiste posude, zalijevanje samo vodom, čuvanje biljaka u relativno suhim uvjetima, dobra zdravstvena zaštita itd.).

Izvorno biljno tkivo od kojega će biti uzeti eksplantati i postupak koji će se primijeniti imaju kritičnu ulogu u uspješnom postavljanju mikrokloniranja.

Ako genetska stabilnost tkiva varira, tako će i tipovi tkiva eksplantata koji se upotrebljavaju za kulturu utjecati na varijabilnost reprodukcije. Vršni se meristem preporučuje u tome smislu jer pruža određenu sigurnost u odstranjivanju mikroorganizama, koji su izvor zaraze.

1.4.2. Faza 1: uvođenje u kulturu (uspostavljanje aseptične kulture)

Ova faza pokriva sterilnu izolaciju meristema, vegetacijskoga vrška, eksplantata i dr. ako postoji unutrašnja infekcija, potrebno je primijeniti posebne tehnike. Najvažnije u ovoj fazi jest dobivanje sterilnog rasta eksplantata.

Dio postavljenih kultura, ovisno o njihovoj upotrebi i vrijednosti početnog genotipa, može se čuvati kao „majčinski blok“ i služiti za presadnice ili kao izvor klične plazme za buduću upotrebu.

1.4.3. Faza 2: Umnožavanje ili reprodukcija (multiplikacija)

To je faza razmnožavanja (multiplikacije). Glavna je svrha ove faze postići razmnožavanje bez gubitka genetičke stabilnosti. Umnožavanje se obavlja na različite načine. Koji će način biti upotrijebljen ovisit će o svakom specifičnom slučaju, o biološkim ograničenjima vrste, o faktoru umnožavanja potrebnom za dobivanje željenog broja biljaka i posebnih značajki ili potreba određenog klona uvjetovanih genotipom. Tako će npr. kloniranje biljaka koje se upotrebljavaju kao roditelji u stvaranju hibridnog sjemena tražiti metodu multiplikacije koja osigurava visok stupanj genetičke stabilnosti. Ova specifičnost može izbor postupka ograničiti na upotrebu samo aksilarnih pupova (najsporija metoda).

Prilagodбом faktora hranidbene podloge, a osobito sastava hormona i njihove međusobne ravnoteže, obično je najuspjeliji način u regulaciji multiplikacije i regeneracije *in vitro*.

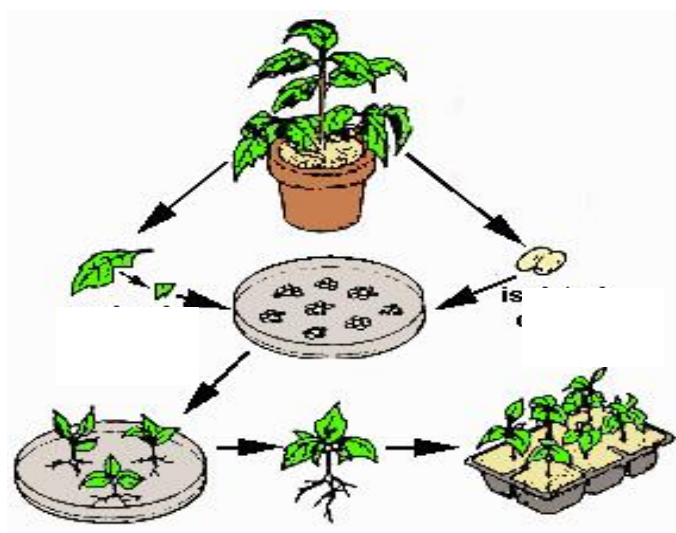
1.4.4. Faza 3: Priprema kultura za prijenos biljčica u zemlju (rizogeneza)

Ona uključuje pripremu izdanaka ili biljaka dobivenih u 2. fazi za prijenos u zemlju. To može uključivati: zaustavljanje stvaranja aksilarnih izdanaka ili/i početak izduživanja izdanaka. Nadalje, treba potaknuti stvaranje korijenja, bilo *in vitro* bilo *in vivo*.

Oblikovani se izdanci fizički odvajaju i obično pojedinačno prenose na podlogu za ukorjenjivanje. Podloge za indukciju korijenja izrazito variraju i ovise o biljnoj vrsti za koju se upotrebljavaju. Ipak, obično se u njima smanjuje ili potpuno odstranjuje citokinin. Izdanci vrsta koje se lako ukorjenjuju mogu se izravno prenijeti u supstrat/zemlju i tako isključiti 3. fazu.

1.4.5. Faza 4: Prijenos biljčica u zemlju (*ex vitro* - aklimatizacija)

U ovoj se fazi biljke prenose iz epruvete (*in vitro*) u zemlju (*ex vitro*) i prilagođavaju na rast u vanjskim uvjetima. Više iscrpnijih informacija, pogotovo kada su u pitanju pojedinačni posebni primjeri mogu se naći u mnogim publiciranim monografijama, originalnim člancima i sl.



Slika 3. Slikovni prikaz kulture tkiva *in vitro*, (Izvor: <http://www.ebioworld.com>)

2. MATERIJAL I METODE

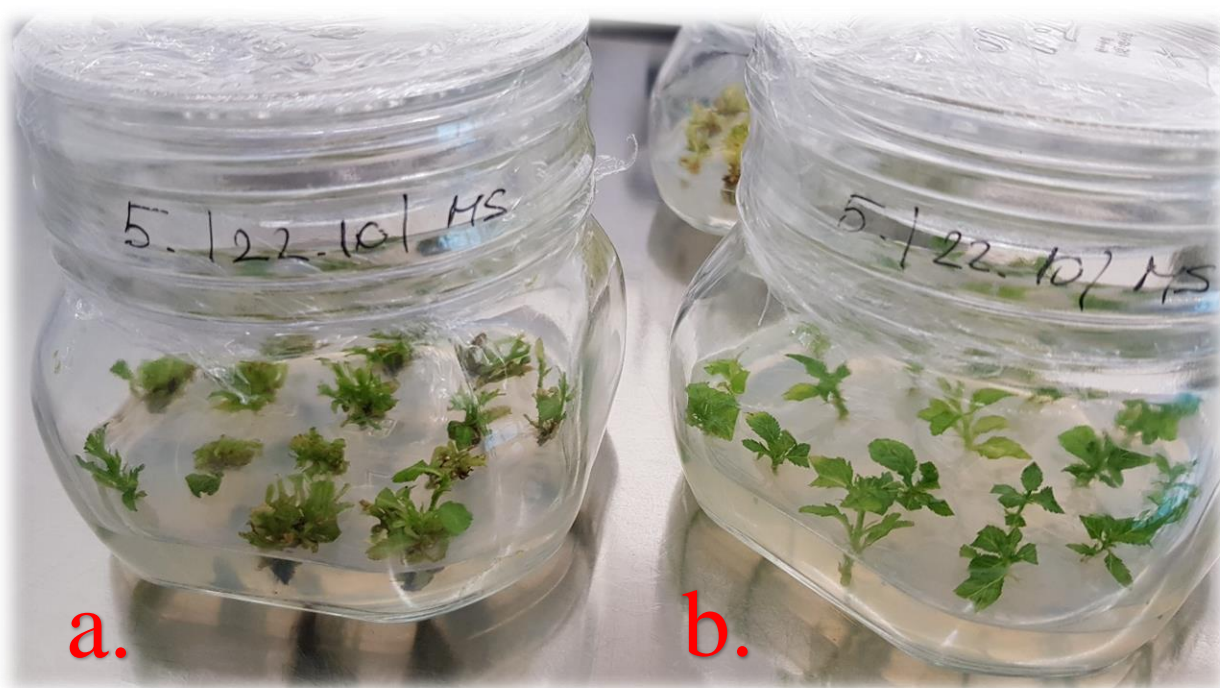
Istraživanje s ciljem ispitivanja mogućnosti organogeneze eksplantata vegetativne podloge trešnje Gisela 5 (*Prunus cerasus x Prunus canescens*) u kulturi tkiva *in vitro* provedeno je u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva u sklopu Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* laboratorij za voćarstvo) na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS) tijekom 2020. godine. Na katedri se obavljaju brojna *in vitro* istraživanja na mnogim voćnim vrstama poput maline, borovnice, lijeske, oraha, paulovnije, vegetativnih podloga, trešnje, višnje, podloga za citrusa, goji, itd. Uz znanstveno istraživački rad i edukaciju studenata, Katedra se bavi i proizvodnjom certificiranog voćnog sadnog materijala. Laboratorij posjeduje svu potrebnu opremu za uspješno provođenje mikropropagacije, matični biljni materijal, TIB sustav (Slika 4.), prostor za aklimatizaciju i klima komoru s kontroliranim uvjetima. U laboratoriju se pored standardne metode koja uključuje kruti medij koristi i suvremeni sustav bioreaktora (TIB/TIS sustav – tekući medij). Kroz ovaj model omogućena je proizvodnja velikog broja voćnih sadnica u još kraćem vremenskom periodu ali i niz mogućnosti koje klasični sustav nema (sekundarni metaboliti, biomasa, itd.).



Slika 4. TIB sustav bioreaktora – Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, FAZOS
(Izvor: Bošnjak, 2020.)

Cilj ovoga završnog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnost mikropropagacije, odnosno organogeneze pojedinih tipova eksplantata vegetativne podloge trešnje Gisela 5 na dva tipa hranjive podloge.

U istraživanju su korištene, odnosno uspoređivan je učinak dvije vrste hranjive podloge: DKW (Driver i Kuniyuki, 1984.) i MS (Murashige i Skoog, 1962.) proizvođača Duchefa Biochemie B.V., Nizozemska na organogenezu dva tipa eksplantata: pojedinačni izdanci i baze izdanaka vegetativne podloge za trešnju Gisela 5 (Slika 5.). Detaljan sastav hranjivih podloga i korištenih koncentracija biljnih hormona (citokinina i auksina) naveden je u tablici 1. i 2.



Slika 5. Tipovi eksplantata: a. baze izdanaka i b. pojedinačni izdanci na MS podlozi, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

Kao izvor eksplantata vegetativne podloge Gisela 5 poslužile su *in vitro* biljke nastali u laboratoriju prijašnjih godina na kojima se provode razna druga istraživanja. U obje korištene podloge dodana je identična koncentracija agara (6.3 g/l), auksina BAP (0.8 mg/l) i citokinina IBA (0.01 mg/l) te je pH vrijednost prije autoklaviranja (120 °C, kroz 20 min i tlaku 1.2 bara) podešena na 5.8 (Tablica 1. i 2.).

Tablica 1. Sastav hranjive podloge MS, (Izvor: Duchefa catalogue, 2010-2012.)

Makro mineralne soli	(mg/l)	Mikro mineralne soli	(mg/l)	Organski i ostali dodatci	(mg/l)
CaCl ₂	332.02	MnSO ₄ x H ₂ O	16.90	Agar	6300.00
KNO ₃	1900.00	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8.60	Saharoza	30000.00
KH ₂ PO ₄	170.00	H ₂ BO ₃	6.20	Glicin	2.00
MgSO ₄	180.54	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25	Myo-inositol	100.00
NH ₄ NO ₃	1650.00	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	Nikotinska kis.	0.50
		CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.025	Piridoksin HCl	0.50
		KI	0.83	Tiamin HCl	0.10
		FeNaEDTA	36.70	BAP	0.8 ml/l
				IBA	0.01 ml/l
				pH	5.8

Tablica 2. Sastav hranjive podloge DKW, (Izvor: Duchefa catalogue, 2010-2012.)

Makro mineralne soli	(mg/l)	Mikro mineralne soli	(mg/l)	Organski i ostali dodatci	(mg/l)
CaCl ₂	112.50	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.25	Agar	6300.00
Ca(NO ₃) ₂ x 2H ₂ O	1664.64	H ₂ BO ₃	4.80	Saharoza	30000.00
KH ₂ PO ₄	265.00	MnSO ₄ x H ₂ O	33.80	Glicin	2.00
K ₂ SO ₄	1559.00	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.39	Myo-inositol	100.00
MgSO ₄	361.49	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	17.00	Nikotinska kis.	1.00
NH ₄ NO ₃	1416.00	FeNaEDTA	44.63	Tiamin HCl	2.00
				BAP	0.8 ml/l
				IBA	0.01ml/l
				pH	5.8

Svi tretmani uključivali su 25 eksplantata u dvije repeticije (ukupno 8 teglica po 25 eksplantata = 200 eksplantata). Nakon inicijacije eksplantata u sterilnim uvjetima laminarne komore, svi tretmani (teglice) postavljeni su u režim svjetlosti 16/8 i temperaturu od 24 °C kroz 30 dana (Slika 6.).



Slika 6. Uvjeti klima komore, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

Nakon 30 dana pristupilo se mjerenju morfoloških parametara (Slika 7.) i evaluaciji pojedinih tretmana u istraživanju.

Mjereni su morfološki parametri:

- ✓ broj izdanaka
- ✓ broj listova
- ✓ dužina izdanaka
- ✓ broj nodija



Slika 7. Mjerenje morfoloških parametara, FAZOS (Izvor: Košutić, 2020.)

3. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon 30 dana svi tretmani uspješni su bez kontaminacije inicirati dovoljnu biomasu potrebnu za morfološka mjerenja. Nije zabilježen stresni utjecaj podloge ili uvjeta klima komore kroz period organogeneze (Slika 8.).

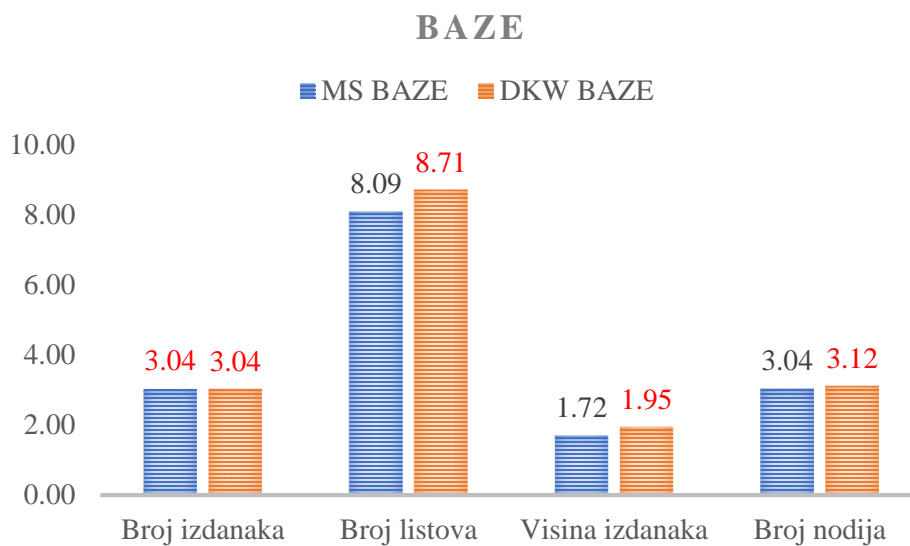


Slika 8. Eksplantati na MS hranjivoj podlozi nakon 30 dana, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

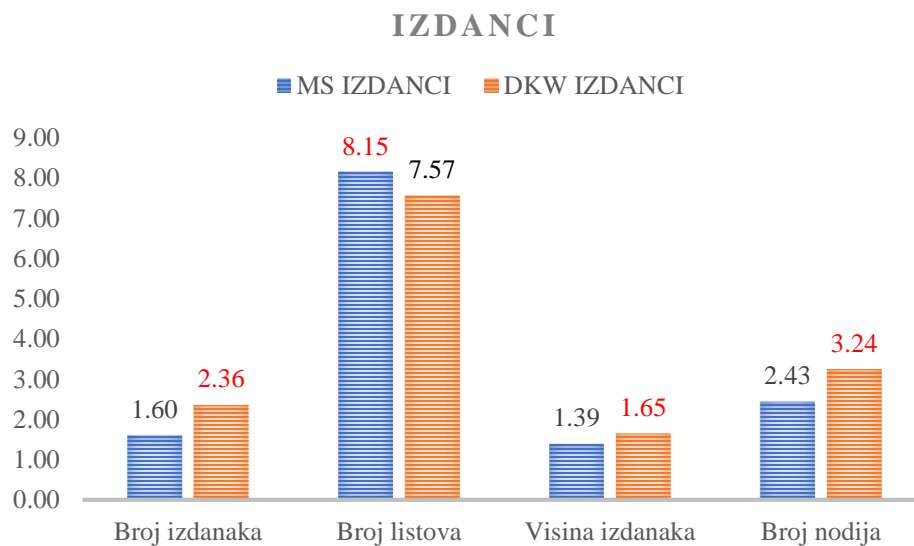
3.1. Razlike između podloga u organogenezi eksplantata Gisela 5

Tretman na DKW mediju koji je uključivao baze izdanaka rezultirao je većom visinom izdanaka (1.95), brojem nodija (3.12) i brojem listova (8.7) dok je broj izdanaka (3.04) bio podjednak na oba korištena medija (Grafikon 2.). Tretman koji je uključivao eksplantata s pojedinačnim izdancima (Grafikon 3.) također je na istoj podlozi (DKW) rezultirao većim brojem novih izdanaka (2.36), visinom izdanaka (1.65) i brojem nodija (3.24). U konačnici DKW hranjiva podloga rezultirala je nešto boljim morfološkim parametrima na oba tipa eksplantata. Produkcija većih i brojnijih izdanaka DKW podloge daje joj prednost pri izboru hranjivog medija, što je i poželjno ukoliko nam se nameće daljnja faza rizogeneze, a također i daljnja multiplikacija

biljnog materijala. Na MS podlozi jedino je broj listova na tretmanu s pojedinačnim izdancima (8.15) bio nešto veći (Grafikon 3.).



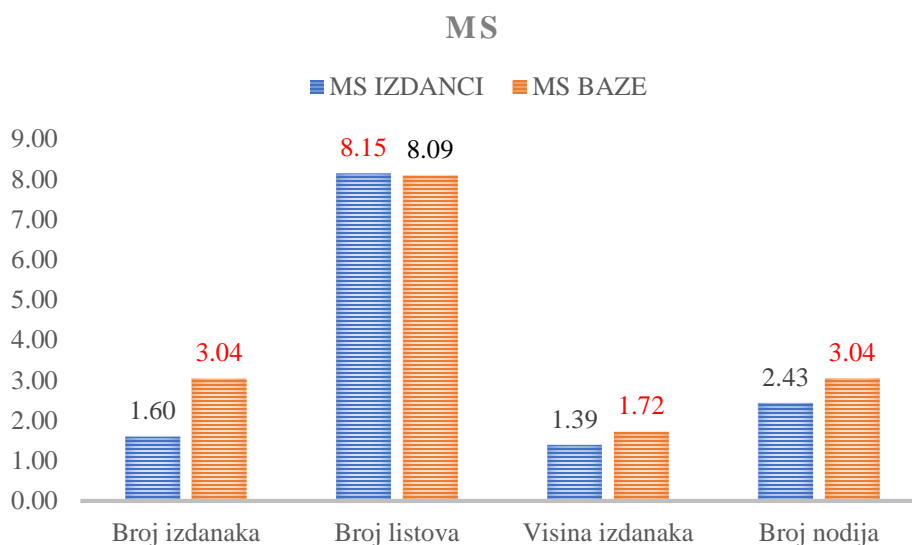
Grafikon 2. Razlike između podloga (MS i DKW) u organogenezi baza izdanaka



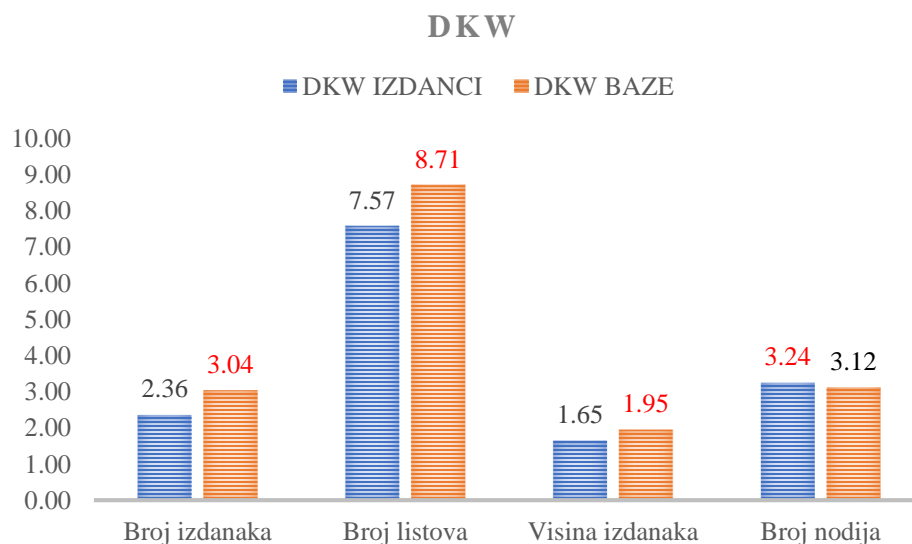
Grafikon 3. Razlike između podloga (MS i DKW) u organogenezi pojedinačnih izdanaka

3.2. Razlike između tipa eksplantata u organogenezi Gisela 5

Tretman koji je uključivao baze izdanaka na obje hranjive podloge rezultirao je većim brojem (3.04 DKW i MS) i visinom izdanaka (MS – 1.72 i DKW – 1.95) u odnosu na tretman s pojedinačnim izdancima (Grafikon 4. i 5.). Jedino je broj nodija (3.24) na DKW podlozi i broj listova (8.15) na MS podlozi bio veći na tretmanu s pojedinačnim eksplantatima.



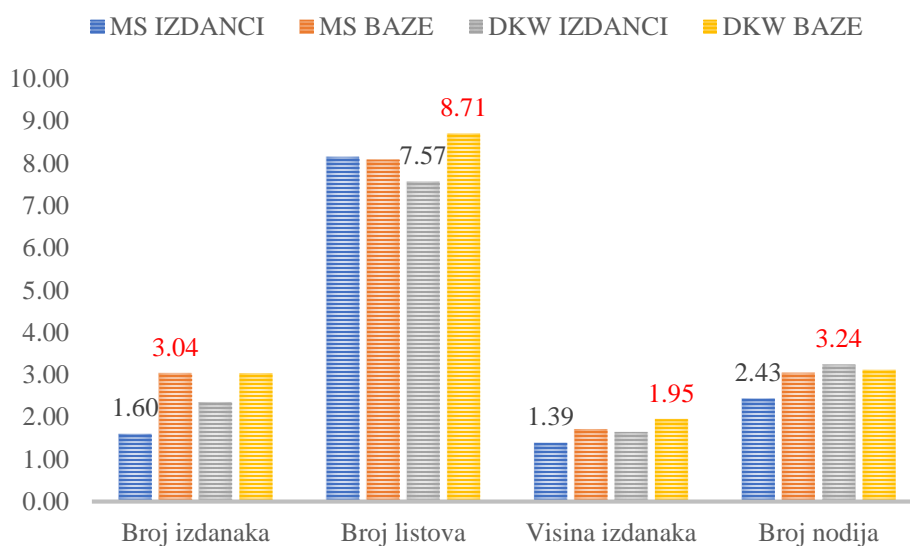
Grafikon 4. Razlike između eksplantata (baze i pojedinačni izdanci) na MS podlozi



Grafikon 5. Razlike između eksplantata (baze i pojedinačni izdanci) na DKW podlozi

3.3. Učinkovitost primijenjenih tretmana u organogenezi eksplantata Gisela 5

Na razini cijelog pokusa (Grafikon 6.) najveći broj izdanaka (3.04) nastao je na eksplantatima s bazama izdanaka, a najmanje na eksplantatima s pojedinačnim izdancima (1.60) na MS mediju. Najveći broj listova (8.71) zabilježen je na tretmanu DKW s bazama izdanaka, a najmanji na tretmanu DKW s pojedinačnim izdancima (7.57). Visina izdanaka na tretmanu DKW s bazama izdanaka (1.95) bila je najveća, dok je najmanja visina zabilježena na tretmanu MS s pojedinačnim izdancima (1.39). Broj nodija bio je najveći na tretmanu DKW s pojedinačnim izdancima (3.24), a najmanji na MS također s pojedinačnim izdancima (2.43).



Grafikon 6. Učinkovitost tretmana na razini cijelog pokusa

Iz dobivenih rezultata organogeneze vidljiva je prednost DKW podloge i tipa eksplantata koji uključuje baze izdanaka (Slika 10.). MS podloga također je inicirala povoljnu biomasu bez vidljivih stresnih znakova na biljni materijal (Slika 9.). Ukoliko nam je cilj daljnja multiplikacija ili rizogeneza tada je upravo DKW podloga bolji izbor. Daljnja istraživanja trebalo bih usmjeriti na određivanje koncentracija pojedinih regulatora rasta (hormona) citokinina i auksina ili primijene drugih vrsta poput zeatina, tidiazurona, 2iP, itd. Također, uočena je i blaga vitifikacija (hiperhidriranost) listova pri bazi eksplantata na svim tretmanima ali je bila u granicama. Daljnja istraživanja usmjeriti i na mogućnost sprječavanja nepoželjne vitifikacije.



Slika 9. Eksplantati nakon 30 dana na MS podlozi, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)



Slika 10. Eksplantati nakon 30 dana na DKW podlozi, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

4. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata zaključujemo sljedeće:

- ✓ Postoji mogućnosti organogeneze oba tipa eksplantata (pojedinačni izdanci i baze izdanaka) Gisela 5 na obje korištene hranjive podloge (DKW i MS).
- ✓ Svi tretmani uspješni su bez kontaminacije inicirati dovoljnu biljnu masu potrebnu za morfološka mjerenja nakon 30 dana.
- ✓ Nije zabilježen stresni utjecaj hranjive podloge ili uvjeta klima komore kroz period organogeneze.
- ✓ Tretman na DKW mediju koji je uključivao baze izdanaka rezultirao je većom visinom izdanaka, brojem nodija i brojem listova.
- ✓ Tretman koji je uključivao eksplantata s pojedinačnim izdancima na istoj podlozi (DKW) rezultirao je većim brojem novih izdanaka i nodija te većom visinom izdanaka.
- ✓ U konačnici DKW hranjiva podloga rezultirala je nešto boljim morfološkim parametrima na oba tipa eksplantata.
- ✓ Biljke nastale iz eksplantata baza izdanaka na obje hranjive podloge inicirale su veći broj i visinu izdanaka u odnosu na tretman s pojedinačnim izdancima.
- ✓ Produkcija većih i brojnijih izdanaka DKW podloge daje joj prednost pri izboru hranjivog medija, što je i poželjno ukoliko nam se nameće daljnja faza rizogeneze, a također i daljnja multiplikacija biljnog materijala.
- ✓ Daljnja istraživanja usmjeriti i na mogućnost sprječavanja nepoželjne vitifikacije i primijene drugih vrsta i koncentracija regulatora rasta (hormona).

5. POPIS LITERATURE

1. Andersen, R.L., Robinson, T., Lang G.A. (1999.): Managing the Gisela cherry rootstock. New York Fruit Quarterly, 7, 4, 1-4.
2. Dale, P.J., Webb, K.J. (1985.): U: SWJ Bright and MGK Jones (Eds.): Cereals Tissue and Cell Culture, Matrinus Nijhoff Publ. Dordrecht, The Netherlands, pp.79-96.
3. Debergh, P., Maene, L. (1981.): Sci. Hortic. 14, 335-345.
4. De Salvador, F.R., Di Tommaso, G., Piccioni, C., Bonofiglio, P. (2005.): Performance of new and standard cherry rootstocks in different soils and climatic condition, Acta Horticulturae, 667, 197-199.
5. Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. (1984): In Vitro Propagation of Paradox walnut Rootstock, Hort. Science, 19(4).
6. Duchefa Catalogue (2010-2012): Plant Cell and Tissue Culture, Phytopatology, Biochemicals, Duchefa Biochemie B.V., Netherlands
7. Franken-Bembenek, S. (2005): Gisela® 5 Rootstock in Germany, Proc. 4th IS on Cherry, Ed. G.A. Lang, Acta Horticulturae. 667, ISHS.
8. Lichev, V., Papachatzis, A. (2006.): Influence of ten rootstocks on cold hardiness of flowers cherry cultivar Bigarreau Burlat, Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture, 25, 3, 296-301.
9. Lichev, V., Papachatzis, A. (2009.): Results from the 11-year evaluation of 10 rootstock of the sweet cherry cultivar Stella, Acta Horticulturae, 825, 513-519.
10. Lugli, S., Bassi, G. (2010): Speciale portinnesti, Ciliegio, Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura, 72, 7-8, 36-42.
11. Milatović, D., Đurović, D., Vulić, T., Đorđević, B., Zec, G. (2011.): Osetljivost novijih sorti trešnje na podlozi Gisela 5 na zimske mrazeve, Zbornik radova III savetovanja Inovacije u voćarstvu, Beograd, 10. februar 2011., pp.231-238.
12. Milatović, D., Nikolić, M., Miletić, N. (2015): Trešnja i višnja, drugo dopunjeno izdanje, Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak, ISBN: 978-86-913763-4-5.
13. Miljković, I. (2011): Trešnja, Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb, ISBN: 978-953-6485-28-4.
14. Murashige, T. (1974.): Ann Rev Plant Physiol., 25, 135-166.

15. Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
16. Palasciano, M., Camposeo, S., Ferrara, G., Gallotta, A., Godini, A. (2008.): Dodici anni di osservazioni sul comportamento di dodici portinnestri per il ciliegio dolce allevati in asciutto in Puglia, *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, 70, 3, 44-50.
17. Sibila, J. (1994.): *Kultura biljnih stanica i tkiva – temeljna istraživanja i primjena*, Školska knjiga, Zagreb, ISBN: 953-0-31110-1.
18. Sitarek, M., Grzyb, Z.S., Omiecinska, B. (2005.): Performance of sweet cherry trees on dwarfing rootstock, *Latvian Journal of Agronomy*, No. 9, 140-145.
19. Smith, D.R. (1986.): U: YPS Bajaj (Ed.): *Biotechnology in agriculture and Forestry 2, Trees I*, Springer-Verlag, Berlin, pp.274-291.
20. Ystaas, J., Froynes, O. (1996): Evaluation of size-controlling rootstocks for Stella and Ulster sweet cherries, *Acta Horticulturae*, 410, 197-204.
21. Walter, E., Franken-Bembenek, S. (1998): Evaluation of interspecific cherry hybrids as rootstocks for sweet cherries, *Acta Horticulturae*, 468, 285-290.