

Organogeneza eksplantanta vegetativne podloge Gisela 6 (Prenus cerasus x Prenus canescens) u kulturi tkiva in vitro

Mijić, Ivana

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:528838>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-07**



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 U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivana Mijić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

**Organogeneza eksplantata vegetativne podloge Gisela 6
(*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) u kulturi tkiva *in vitro***

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivana Mijić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

**Organogeneza eksplantata vegetativne podloge Gisela 6
(*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 6 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) u kulturi tkiva *in vitro*

Ivana Mijić

Sažetak: U voćarskoj i rasadničarskoj proizvodnji RH kronično je aktualan problem nedostatka visoko kvalitetnog reprodukcijuskog sadnog materijala (uvoz, sivo tržište, zdravstveno neispravan materijal upitne kvalitete). Proizvodnja visokokvalitetnog i zdravstveno ispravnog sadnog materijala putem konvencionalnih tehnika (reznice, nagrtanje i sl.) vrlo je teška. Masovnost i brzina razmnožavanja izražena je putem mikropropagacije *in vitro*. Uspoređivana je organogeneza dva tipa eksplantata (pojedinačni izdanci i baze izdanaka) vegetativne podloge trešnje Gisela 6 iniciranih na dvije vrste hranjivih podloga (DKW i MS). Cijeli pokus je proveden u sklopu *in vitro* laboratorija za voćarstvo, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek. Rezultati ukazuju na mogućnost organogeneze oba tipa eksplantata na obje korištene hranjive podloge. Tretman koji je uključivao DKW hranjivu podlogu s pojedinačnim izdancima inicirao je duže izdanke s većim brojem listova i nodija u odnosu na MS medij s istim eksplantatima. Tretmana koji je uključivao baze izdanaka na DKW mediju rezultirao je većim brojem izdanaka i nodija dok je dužina izdanaka bila podjednaka na oba medija. U konačnici obje podloge rezultirale su učinkovito u organogenezi s malom prednosti DKW podloge koja je uključivala eksplantate s bazama izdanaka.

Ključne riječi: trešnja, Gisela 6, mikropropagacija, organogeneza

24 stranica, 2 tablica, 13 grafikona i slika, 53 literaturna navoda
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 6 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) explants in tissue culture

Ivana Mijić

Summary: A deficiency of high-quality reproductive planting material (import, gray market, unhealthy material with questionable quality) is chronically problem in fruit and nursery production in Croatia. The production of high quality and healthy planting material through conventional techniques is very difficult. Mass and reproduction rate is expressed by *in vitro* micropropagation. The organogenesis of two types of explants (individual shoots and base of shoots) on the vegetative rootstock of sweet cherry Gisela 6 initiated on two types of nutrient medium (DKW and MS) was compared. The whole experiment was carried out on *in vitro* laboratory for fruit growing, Faculty of Agrobiotechnical Science Osijek. The results indicate the possibility of organogenesis both types of explants in both used culture media. Treatment involving DKW nutrient medium with single shoots initiated longer shoots with more leaves and nodes compared to MS medium with the same type of explant. Treatments that included shoot bases on DKW medium resulted in more shoots and nodes, while shoot lengths were equal on both used media. Ultimately, both nutrient medium resulted efficiently in organogenesis with little advantage to DKW medium, which included shoot base explants..

Keywords: sweet chery, Gisela 6, micropropagation, organogenesis

24 pages, 2 tables, 13 figures, 53 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. Oplemenjivački rad u proizvodnji podloga trešnje.....	2
1.2. Gisela.....	5
1.2.1. Gisela 6 – povijest i karakteristike.....	6
1.3. Kultura tkiva <i>in vitro</i> – mikropropagacija.....	7
2. MATERIJAL I METODE	11
3. REZULTATI I RASPRAVA	14
3.1. Rezultati organogeneze eksplantata na DKW podlozi.....	14
3.2. Rezultati organogeneze eksplantata na MS podlozi.....	15
3.3. Razlike između DKW i MS podloge u organogenezi pojedinačnih izdanaka.....	16
3.4. Razlike između DKW i MS podloge u organogenezi baza izdanaka.....	17
3.5. Učinkovitost primijenjenih tretmana u organogenezi eksplantata.....	18
4. ZAKLJUČAK	19
5. POPIS LITERATURE	20

1. UVOD

Danas u svijetu postoji veliki broj podloga koje se koriste u proizvodnji sadnica trešanja. Generativne podloge (sijanci, divljačice) se proizvode iz sjemena divljih vrsta ili rjeđe sorti trešnje. Najviše se koriste sijanci divlje trešnje (*Prunus avium*) i magrive (*P. mahaleb*).

Vegetativne podloge se proizvode vegetativnim razmnožavanjem, najčešće nagrtanjem, reznicama ili u specijaliziranim suvremenim laboratorijima putem mikropropagacije. Najčešće se koriste vegetativne podloge koje potječu od divlje trešnje, magrive, ukrasnih vrsta trešanja ili interspecies hibrida nastalih križanjem dvije ili više vrsta.

Uspjeh u proizvodnji trešnje u velikoj mjeri ovisi o podlozi na kojoj se ona uzgaja. Politikom poticanja malih ali i većih poljoprivrednih gospodarstava, odnosno subvencijama europskih fondova posljednjih godina dolazi do povećanja interesa za podizanje novih intenzivnih nasada trešanja. Sve je veći interes mladih proizvođača koji uslijed uvida u loše stanje po pitanju otkupne cijene nekog drugog voća ulažu svoja sredstva upravo u podizanje novih nasada pod trešnjama.

Posljedica navedenog je povećana potražnja proizvođača za certificiranim i zdravim sadnim materijalom. U voćarskoj i rasadničarskoj proizvodnji RH kronično je aktualan problem nedostatka visoko kvalitetnog reprodukcijskog sadnog materijala (uvoz, sivo tržište, zdravstveno neispravan materijal upitne kvalitete).

Suvremena znanstvenoistraživačka praksa razvijenih zemalja EU u produkciji specijaliziranih i strateških biljnih kultura u potpunosti se temelji na uporabi suvremenih biotehnoloških metoda. *In vitro* mikropropagacija kulturom tkiva osigurava dobivanje visokokvalitetnog i fitosanitarno ispravnog biljnog materijala u vrlo kratkom vremenskom intervalu neovisno od klimatskih uvjeta.

Cilj ovoga završnog rada je ispitati mogućnost mikropropagacije, odnosno organogeneze pojedinih tipova eksplantata vegetativne podloge trešnje Gisela 6 na dva tipa hranjive podloge.

1.1. Oplemenjivački rad u proizvodnji podloga trešnje

Kao i ostale voćke trešnja se može razmnožavati na dva načina: generativno (pomoću sjemena) ili vegetativno (pomoću vegetativnih organa). Pri generativnom razmnožavanju dobiva se potomstvo koje je heterogeno (neujednačeno) i nema iste osobine kao matična biljka. Pri vegetativnom razmnožavanju se dobiva homogeno (uniformno) potomstvo, koje je po svojim osobinama identično matičnoj biljci.

Postoje dva tipa vegetativnog razmnožavanja: razmnožavanje na vlastitom korijenu i cijepljenje.

Razmnožavanje na vlastitom korijenu se vrši pomoću izdanaka, reznica, nagrtanjem ili mikropropagacijom. Ovaj način razmnožavanja se primjenjuje pri proizvodnji vegetativnih podloga. Sorte trešnje se teško razmnožavaju na ovaj način, tako da on ima mali značaj u proizvodnji sadnog materijala. Cijepljenje (transplantacija, kalemljenje, navrtanje) predstavlja spajanje dvije komponente: podloge i plemke u novu biljku. Podloga (hipobiont) je donji dio cijepa koji vrši ulogu korijena, a plemka (epibiont) je gornji dio cijepa koji vrši ulogu stabla (Slika 1.). Cijepljenje je najpoznatiji način proizvodnje sadnica trešnje.



Slika 1. Razlike između podloge i plemke

(Izvor: <https://www.foodnetwork.com>)

Danas u svijetu postoji veliki broj podloga koje se koriste za proizvodnju sadnica trešnje. One se prema podrijetlu mogu podijeliti u dvije grupe: generativne i vegetativne podloge. Generativne podloge (sijanci, sjemenjaci) se proizvode iz sjemena divljih vrsta ili rjeđe sorti trešnje. Najviše se koriste sijanci divlje trešnje (*Prunus avium*) i magrive (*P. mahaleb*).

U našoj zemlji u proizvodnji sadnica trešnje koriste se većinom upravo generativne podloge divlje trešnje i magrive. Zastupljenost vegetativnih podloga je vrlo mala.

Uspjeh u proizvodnji trešnje u velikoj mjeri ovisi o podlozi na kojoj se one uzgajaju. Podloga mora imati dobar afinitet (podudaranost, kompatibilnost) sa sortama. Pored toga, podloga mora biti prilagođena tlu i klimi uzgojnog područja ali i da povoljno djeluje na rast, rodnost i kvalitetu plodova cijepljenih sorti.

Da bi spojno mjesto dobro sraslo, a voćke kasnije normalno rasle i rađale potrebno je da između podloge i plemke postoji dobar afinitet (kompatibilnost). Uspjeh pri cijepljenju je veći ukoliko je botanička srodnost komponenti veća. To je obično slučaj pri cijepljenju u okviru iste vrte ili dvije genetski srodne vrste, koje pripadaju istom podrodu ili rodu (Slika 2.).



Slika 2. Sadnica trešnje s dobrim afinitetom (kompatibilnosti) između podloge i plemke
(Izvor: <http://jmcextman.blogspot.com/>)

Podloga utječe na osobine sorti koje su na njoj cijepljene kao što su: bujnost, početak rodnosti, rodnosti, vrijeme cvjetanja i zriobe te kvaliteta ploda.

Kod nas se pretežno koriste generativne podloge, koje se odlikuju velikom bujnošću, koju prenose i na cijepljene sorte. Od podloga za trešnju najveću bujnost ima divlja trešnja. Vegetativne podloge slabije bujnosti uglavnom govore da sorte cijepljene na njima ranije rode, ali to nije uvijek slučaj. Na primjer, belgijske podloge Inmil i Damil koje su slabo bujne, ne utječu na ranije stupanje sorti trešnje u rod (Webster i Schmidt, 1996.).

Prinos po stablu je veći kod sorti trešnje cijepljenim na bujnim podlogama, dok je prinos po jedinici površine veći na slabije bujnim podlogama.

Podloga utječe i na kvalitetu ploda cijepljenih sorti, osobito na krupnoću. Podloge koje utječu na veću rodnost, istovremeno utječu i na smanjenje krupnoće ploda. To je osobito izraženo kod uzgajanja samooplodnih sorti trešnje na slabo bujnim podlogama, kao što su Gisela 5, Inmil i Tabel (Edobriz).

Utvrđeno je da podloge imaju značajan utjecaj i na kemijski sastav ploda: sadržaj suhe tvari, kiselina, šećera i fenolnih komponenti (Goncalves i sur., 2006.; Jakobek i sur., 2009.; Usenik i sur., 2010.).

U svijetu se intenzivno radi na stvaranju novih podloga za trešnju. Hrotko (2008.) navodi kako programi oplemenjivanja podloga za trešnju postoje u 17 zemalja i da je u okviru njih stvoreno više od 100 novih podloga. Od toga, najveći broj čine interspecies hibridi (42) i podloge koje potječu od *P. cerasus* (41), dok znatno manje podloga potječe od *P. avium* i *P. mahaleb* (po 12).

Ciljevi oplemenjivanja podloga za trešnju su sljedeći :

- Slaba do umjerena bujnost (posebno važno ako se trešnja cijepi)
- Dobar afinitet (kompatibilnost) sa sortama trešnje
- Rano stupanje u rod i visoka rodnost cijepljenih sorti
- Otpornost na niske temperature (posebno u područjima sa hladnijom klimom)
- Prilagođenost različitim tipovima tla
- Otpornost na uzročnike bolesti i štetočine
- Što veća uniformnost osobina
- Dobro ukorjenjivanje na stalnom mjestu

- Smanjeno stvaranje izdanaka
- Dobra kvaliteta ploda cijepljenih sorti

Kod generativnih podloga je važno da sjeme ima dobru klijavost, sjemenjaci budu vitalni i da ne formiraju bočne grančice u zoni cijepa. Vegetativne podloge trebaju se lako vegetativno umnožavati.

Pregled najznačajnijih vegetativnih podloga za trešnju stvorenih putem interspecies hibridizacije je prikazan u tablici 1. (Perry 1987.; Webster i Schmidt 1996.; Anonymous 1997.; Eremin i sur., 2000.; De Salvador i Lugli 2002.; Mazilu i sur., 2013.).

Tablica 1. Pregled najznačajnijih interspecies vegetativnih podloga za trešnju, (Izvor: Milatović i sur., 2015.)

PODLOGA	ZEMLJA	MJESTO	RODITELJI
Avima (Argot)	Francuska	Lorette	<i>P. mahaleb</i> * <i>P. avium</i>
Colt, Cob	Engleska	East Malling	<i>P. avium</i> * <i>P. pseudocerasus</i>
Dropmore	Kanada	Manitoba	<i>P. cerasus</i> * <i>P. pensylvanica</i>
Gisela 1	Njemačka	Giessen	<i>P. fruticosa</i> * <i>P. avium</i>
Gisela 4	Njemačka	Giessen	<i>P. avium</i> * <i>P. fruticosa</i>
Gisela 3, 5, 6, 7, 8	Njemačka	Giessen	<i>P. cerasus</i> * <i>P. canescens</i>
Gisela 10	Njemačka	Giessen	<i>P. fruticosa</i> * <i>P. cerasus</i>
Gisela 11, 12	Njemačka	Giessen	<i>P. canescens</i> * <i>P. cerasus</i>
Inmil	Belgija	Gembloux	<i>P. incisa</i> * <i>P. serrula</i>
Izmajlovskaja	Rusija	Moskva	<i>P. maackii</i> * (<i>P. cerasus</i> * <i>P. maackii</i>)
IP-C1	Rumunjska	Pitesti	<i>P. cerasus</i> * <i>P. avium</i>
IP-C2, IP-C3	Rumunjska	Pitesti	<i>P. cerasus</i> * <i>P. subhirtella</i>
IP-C4	Rumunjska	Pitesti	<i>P. avium</i> * <i>P. pseudocerasus</i>
IP-C5, IP-C7	Rumunjska	Pitesti	<i>P. avium</i> * <i>P. nipponica</i> var. <i>kurilensis</i>
LC-52	Rusija	Krimsk/Moskva	<i>P. cerasus</i> * (<i>P. cerasus</i> * <i>P. maackii</i>)
Moskovija	Rusija	Moskva	<i>P. maackii</i> * (<i>P. cerasus</i> * <i>P. maackii</i>)
M*M (Ma*Ma) serija	SAD, Oregon	Forest Grove	<i>P. mahaleb</i> * <i>P. avium</i>
OCR-2, OVP-3	SAD, Oregon	Forest Grove	<i>P. avium</i> * <i>P. mahaleb</i>
Oppenheim	Njemačka	Oppenheim	<i>P. fruticosa</i> * <i>P. cerasus</i>
OVP-2, OVP-3	Rusija	Orel	<i>P. cerasus</i> * <i>P. maackii</i>
PHL A, B, C	Češka	Holovousy	<i>P. avium</i> * <i>P. cerasus</i>
Pi-Ku 1 (4,20)	Njemačka	Dresden-Pillnitz	<i>P. avium</i> *(<i>P. canescens</i> * <i>P. tomentosa</i>)
Pi-Ku 2 (4.22)	Njemačka	Dresden-Pillnitz	(<i>P. canescens</i> * <i>P. tomentosa</i>)* <i>P. avium</i>
Pi-Ku 3 (4,83)	Njemačka	Dresden-Pillnitz	<i>P. pseudocerasus</i> *(<i>P. canescens</i> * <i>P. incisa</i>)
Pi-Ku 4 (1,10)	Njemačka	Dresden-Pillnitz	<i>P. cerasus</i> *(<i>P. kurilensis</i> * <i>P. sargentii</i>)
Prob	Mađarska	Budimpešta	<i>P. fruticosa</i> * <i>P. mahaleb</i>
Rubin	Rusija	Orel	<i>P. cerasus</i> * <i>P. maackii</i>
STO3	Njemačka	Kressbronn	<i>P. cerasus</i> * <i>P. schmittii</i>
V-2-180, V-2-230	Rusija	Orel	<i>P. cerasus</i> *(<i>P. cerasus</i> * <i>P. maackii</i>)
V-5-88, V-5-172	Rusija	Orel	<i>P. cerasus</i> *(<i>P. cerasus</i> * <i>P. maackii</i>)
VC-13	Rusija	Krimsk/Moskva	<i>P. cerasus</i> *(<i>P. cerasus</i> * <i>P. maackii</i>)
VSL-1, VSL-2	Rusija	Krimsk	<i>P. fruticosa</i> * <i>P. lannesiana</i>

1.2. Gisela

Podloge serije Gisela nastale su u Njemačkoj na fakultetu Justus Liebig u mjestu Giessen putem interspecies hibridizacije između vrsta *P. avium*, *P. cerasus*, *P. fruticosa* i *P. canescens*. Oplemenjivači su W. Gruppe i H. Schmidt. Ove podloge su patentirane, a nositelj licence je Consortium Deutscher Baumschulen GmbH.

Podloge serije Gisela se razmnožavaju zelenim reznicama ili mikropropagacijom. One su različite bujnosti, a prevladavaju slabo bujne i srednje bujne podloge. Ove podloge utječu na povećanje generativnog potencijala sorti trešnje koji se očituje u povećanju broja svibanjskih kitica po dužini grane, cvjetnih pupoljaka po svibanjskoj kitici kao i cvjetova u cvatu. Manja bujnost kao i veći generativni potencijal utječu i na višestruko povećanje prinosa po jedinici površine i poprečnog presjeka debla u odnosu na standardne podloge (Ystaas i Froynes 1996.; Walter i Franken-Bembenek, 1998.).

Od podloga serije Gisela, najviše su rasprostranjene podloge Gisela 5 i Gisela 6. Pored njih, značajne su i podloge Gisela 1, 3, 4, 7, 10 i 12.

1.2.1. Gisela 6 – povijest i karakteristike

Gisela 6 (148/1) Triploidan je hibrid dobiven križanjem *P. cerasus* (sorta Krupna lotova) x *P. canescens*. U proizvodnji je od 1994. godine. Ima dobra rizogena svojstva. Razmnožava se uglavnom mikropropagacijom. Adaptibilnost na pojedina tla je znatno bolja u odnosu na podlogu Gisela 5. Bolje podnosi sušu, uspijeva i na manje plodnim tlima, a podnosi i teža te glinovita tla. Nije pogodna za suviše topli klimat kao što je mediteranska regija (Lugli i Bassi, 2010.). Tolerantna je na rak korijena (*Agrobacterium tumefaciens*). Osjetljiva je na *Pseudomonas spp.*, *Armillaria mellea*, umjereno osjetljiva na *Phytophthora spp.*, a slabo osjetljiva na *Blumeriella jaopii*. Iako se uglavnom navodi da se dobro ukorjenjuje, poznati su i suprotni rezultati (Balmer, 2008.). Poželjno je korištenje naslona, barem u prvim godinama po sađenju. Nije sklona formiranju izdanaka i ima dobar afinitet s većinom sorti trešanja. Sorte cijepljene na njoj imaju manju bujnost oko 50 – 70 % u odnosu na sijanac divlje trešnje. Rezultira većim kutom grananja i otvorenijim rastom krošnje. Sorte na ovoj podlozi rano ulaze u rod, dobre su rodnosti i imaju dobru krupnoću ploda. Pogodna je za gušću sadnju 800 – 1200 stabala po hektaru. Gisela 6 je vrlo respektabilna srednje bujna podloga za trešnju. Veće je bujnosti od Gisele 5, ali sorte na njoj ranije rode i dobro rađaju.

Pored toga, bolje je adaptivnosti na tlo i manje je zahtjevna u pogledu agrotehničkih mjera. Kada se na njoj cijepe samooplodne ili vrlo rodne sorte, preporučuje se jača gnojidba i rezidba u cilju održavanja vegetativnog rasta i krupnoće ploda.

Proizvodnja visokokvalitetne i zdravstveno ispravne podloge Gisela 6 putem konvencionalnih tehnika (reznice, nagrtanje) uslijed brzo rastuće unutrašnje potražnje od strane proizvođača vrlo je teška. Masovnost i brzina razmnožavanja izražena je putem mikropropagacije *in vitro*.

1.3. Kultura tkiva *in vitro* – mikropropagacija

Pod terminom „kultura *in vitro*“ (skraćeno od „*in vitro* - kultura biljnih stanica, tkiva i organa“) podrazumijeva se uzgoj dijelova biljaka (pojedinačnih stanica, tkiva ili organa) u aseptičnim uvjetima na određenoj hranjivoj podlozi. Primjena kulture *in vitro* znatno je osuvremenila vegetativno razmnožavanje biljaka, jer je omogućila značajnu uštedu prostora, vremena i energije. Ona predstavlja sustav koji se koristi za fiziološka, biokemijska i genetska istraživanja, a primjenjuje se i kao dopuna klasičnim metodama oplemenjivanja. Kultura *in vitro* se zasniva na principu izoliranja dijelova biljke i njihovom uzgajanju u odgovarajućim uvjetima u kojima oni mogu istaknuti svoju regenerativnu sposobnost. To se postiže korištenjem hranjivih podloga, čije su osnovne komponente neorganske soli, izvori ugljika i energije, vitamini, fitohormoni i organski dušik. Kod trešnje se koristi više tehnika kulture *in vitro*, kao što su: mikropropagacija, organogeneza, somatska embriogeneza, somatska hibridizacija, kultura embrija, androgeneza, dobivanje bezvirusnih biljaka i dr.

Mikropropagacija je vegetativno umnožavanje biljaka *in vitro* od dijelova izdanaka. Pri tome se regeneracija biljaka vrši preko formiranja vršnih ili bočnih pupoljaka. Kao eksplantati za mikropropagaciju se najčešće koriste: vršni meristemi izdanaka ili segmenti nodija. Postupak mikropropagacije kod voćaka je razrađen tijekom 70-ih godina 20.st., a kod trešnje najveću primjenu ima u proizvodnji vegetativnih podloga. Na primjer, jedna od najznačajnijih vegetativnih podloga za trešnju Gisela 5 se isključivo razmnožava ovom metodom (Ružić i Cerović, 2003.). Pored podloga, mikropropagacija je korištena i kod raznih divljih vrsta trešnje: (Snir, 1982.; Yang i Schmidt, 1994.; Ružić i sur., 2005.; Druart, 2013.). Za širu primjenu ove metode u razmnožavanju sorti potrebna su višegodišnja istraživanja *ex vitro* biljaka, koja su kod voćaka rijetka. Generalno, kod voćaka dobivenih mikropropagacijom zapaža se veća bujnost i veći prinos (Ružić i Cerović, 2003.). Stabla

trešnje sorte Lambert dobivena mikropropagacijom su bila slične bujnosti kao stabla cijeljena na podlozi F12/1, a imala su i veću rodnost (Quamme i Brownlee, 1993.).

Organogeneza je jedan od načina vegetativnog razmnožavanja *in vitro* u kojem se regeneracija biljaka vrši preko formiranja pupoljaka. Ona može biti indirektna, kada se pupoljci diferenciraju iz epidermalnih i subepidermalnih stanica, bez prethodnog formiranja kalusa (Nikolić, 2007.). Kod podloge za trešnju Colt regeneracija izdanaka je uspostavljena iz korijena (Jones i sur., 1984.) i iz internodija izdanaka (James i sur., 1984.). Lane i Cossio (1986.) su uspjeli regenerirati čak 70% biljaka iz kotiledona nezrelih embrija trešnje sorte Van. Uspješna regeneracija je provedena i korištenjem dijelova lista kao eksplantata na divljoj trešnji i podlogama F12/1 i Charger (Hammatt i Grant, 1998.), kao i kod većeg broja sorti trešnje (Tang i sur., 2002.; Takashina i sur., 2003.; Bhagwat i Lane, 2004.). Matt i Jehle (2005.) su kod pet sorti trešnje dobili znatno veći broj ožiljenih izdanaka (50%) kada su kao eksplantat koristili dijelove internodija u odnosu na listove (11%). Canli i Tian (2008.) su kod pet sorti trešnje uspješno ostvarili regeneraciju izdanaka korištenjem zrelih kotiledona.

Somatska embriogeneza je postupak u kojem se iz jedne ili grupe somatskih stanica koje nisu produkti fuzije gameta razvija i diferencira biljka, prolazeći kroz embrionalne stadije. Somatski embriji su bipolarni, odnosno sadrže meristem izdanaka i korijena. Njihov nastanak može biti spontan ili induciran nekim stimulatorom, kao što je visoka koncentracija auksina. Kod divlje trešnje (*P. avium*) rani stadiji somatske embriogeneze su dobiveni iz kulture protoplasta (David i sur., 1992.), dok su kasniji stadiji dobiveni iz nezrelih zigotnih embrija (De March i sur., 1993.). Iako je kasnije postupak somatske embriogeneze znatno poboljšan (Garin i sur., 1998.; Reidiboym-Telleux i sur., 1999.) i dalje je broj biljaka koje se razvijaju iz somatskih embrija mali. Za razliku od divlje trešnje, nešto bolji rezultati su dobiveni kod podloge Colt (Gutierrez-Pesce i sur., 1998.; Mandegaran i sur., 1999.; Gutierrez-Pesce i Rugini, 2004.).

Somatska hibridizacija je postupak dobivanja hibridnih biljaka putem fuzije protoplasta. Primjenjuje se između vrsta kod kojih ne uspijeva spolna hibridizacija zbog razlike u broju kromosoma i nehomologije gena. Da bi se dobili biljni protoplasti potrebno je ukloniti staničnu stjenku, što se postiže njenom razgradnjom pomoću otopine enzima pektinoze i celuloze. Kod podloge za trešnju Colt, Ochatt i sur., (1987.) su uspjeli regenerirati biljke iz protoplasta mezofila lista. Ochatt i sur., (1989.) su također stvorili somatske hibride između podloge Colt (*Prunus avium* * *Prunus pseudocerasus*) i divlje kruške (*Pyrus communis* var.

pyraster). Iz kalusa ovog somatskog hibrida uspjeli su dobiti cijele biljke, koje se razvijaju *in vivo*.

Kultura embrija (embriokultura) je postupak kultivacije embrija ili pojedinih njegovih dijelova na hranjivoj podlozi pod aseptičnim uvjetima. Ona se koristi kod dobivanja sijanaca od nedovoljno razvijenih embrija vrlo ranih i ranih sorti trešnje. Ako se u hibridizaciji kao ženski roditelj koriste sorte trešnje koje sazrijevaju vrlo rano ili rano, njihovi embriji su nepotpuno razvijeni i u prirodnim uvjetima ne mogu uspješno klijeti ili dati normalne biljke. Uspjeh embriokulture u prvom redu zavisi o stadiju u kojem se nalazi embrio u vrijeme izolacije. Po pravilu, što je embrio mlađi, uspjeh je lošiji. Kod trešnje je utvrđeno da ukoliko je veličina embrija 3 – 4 mm značajno se povećava šansa za uspjeh embriokulture (Ivanicka i Petrova, 1980.). Stanys (1998.) je ispitivao utjecaj razvijenosti embrija na regeneraciju biljaka *in vitro* kod četiri sorte trešnje i dobio je najveći broj biljaka (48 – 100 %), ukoliko su embriji bili uzeti 6 - 9 tjedana nakon punog cvjetanja. Također je važan i sastav hranjive podloge. Osnovne komponente podloge su ugljikohidrati (saharoza), mineralne soli (makro i mikro elementi) i stimulatori rasta (vitamini i hormoni). Najčešće se koriste čvrste hranjive podloge koje sadrže 20 do 30 g/l saharoze, 6 do 8 g/l agar-agar i mineralnu otopinu prema Murashige i Skoog (1962.). Kada se pripremi odgovarajuća hranjiva podloga, ona se izlije u epruvetu do visine 2 - 3 cm. Epruvete se zatvore čepom i steriliziraju u autoklavu. Po hlađenju podloge, vrši se inicijacija kulture. Za to se mogu koristiti čitave sjemenke ili sjemenke s kojih je odstranjena ljuska. Smatra se da je uklanjanje ljuske poželjno, jer ona sadrži veće količine abscizinske kiseline (ABA), koja djeluje inhibitorno na klijanje sjemena. Ovim postupkom se ubrzava dobivanje biljaka, ali se istovremeno povećava rizik od infekcije. Epruvete sa sjemenkama se zatim čuvaju na hladnom (hladnjak) pri temperaturi 2 – 5 °C do pojave korjenčića. U tom razdoblju se vrši proces jarovizacije. Kada korjenčići embrija počnu s klijanjem, kultura se prebacuje u klima-komoru s temperaturom 22 – 25 °C i režimom od 16 sati svjetlosti i 8 sati mraka. U ovim uvjetima kultura ostaje nekoliko tjedana, dok se na mladim sijancima ne razvije 4 - 6 listova. Nakon toga, sijanci se prenose na aklimatizaciju gdje se presađuju u supstrat koji se sastoji od pijeska, treseta i perlita. Prije presađivanja je važno da se korijenov sustav sijanaca dobro ispere sterilnom vodom, da bi se uklonile zaostale čestice hranjive podloge, jer se na njima mogu razviti različiti mikroorganizmi. Presađivanje biljaka sa hranjive podloge iz sterilnih uvjeta u supstrat je najkritičnija faza embriokulture. U tom periodu propadne najveći broj biljaka. Osnovni uzrok za to je gubitak vode uslijed transpiracije. Da bi se to izbjeglo, mlade sijance treba

držati jedan period (do dva tjedna) u uvjetima visoke relativne vlage zraka (95 – 100 %). To se postiže stalnim orošavanjem uz primjenu „mist“ ili „fog“ sustava. Budući da takvi uvjeti pogoduju napadu patogena, potrebno je obaviti tretiranje fungicidima. Početkom svibnja, sijanci se prebacuju iz staklenika i presađuju u otvoreno polje.

Androgeneza (kultura antera - prašnika) je *in vitro* tehnika koja omogućava dobivanje haploidnih biljaka iz mikrospora. Biljke se mogu formirati direktnom androgenozom ili preko prijelaznog kalusnog oblika tj. organogenezom iz haploidnog kalusa. Kod ovako dobivenih haploidnih biljaka udvostručivanjem broja kromosoma, spontano ili pomoću kolhicina, mogu se dobiti homozigotne diploidne biljke. Time se značajno skraćuje proces dobivanja čistih linija u odnosu na klasičan postupak (inbreeding). U dosadašnjim istraživanjima kod trešnje jedino je sa uspjehom stvoren haploidni kalus, ali iz njega nisu regenerirane biljke (Hofer i Hanke, 1990 i 1994.; Long i sur., 1994.; Jevremović i sur., 2004.).

Kultura *in vitro* može se koristiti i za dobivanje bezvirusnih (virus-free) biljaka, što je naročito značajno u proizvodnji zdravog sadnog materijala voćaka. Postoji više načina za dobivanje bezvirusnih biljaka, kao što su termoterapija, kultura meristema i kemoterapija. Termoterapija predstavlja izlaganje biljke ili njegovih dijelova toplini u određenom vremenskom periodu. Kod koštičavih voćaka obično se primjenjuju temperature od 33 – 35 °C koje utječu na usporavanje ili prestanak umnožavanja virusa. Kultura meristema (vrhova izdanaka dužine manje od 1 mm) također može doprinijeti eliminaciji virusa, a uspjeh je veći ukoliko je eksplantat manji. Kemoterapija je postupak korištenja pojedinih kemijskih spojeva koji inhibiraju razvoj virusa (najčešće putem dodavanja u hranjivu podlogu). Najčešće se koristi spoj pod nazivom virazin (Virazol®). Kod trešnje je korišteno više metoda za eliminiranje virusa, ali je najbolje rezultate dalo kombiniranje dvije ili više metoda istovremeno (Deogratias i sur., 1989.; Gella i Errea, 1998.; Howell i sur., 2001.; Cieslinska, 2007.).

2. MATERIJAL I METODE

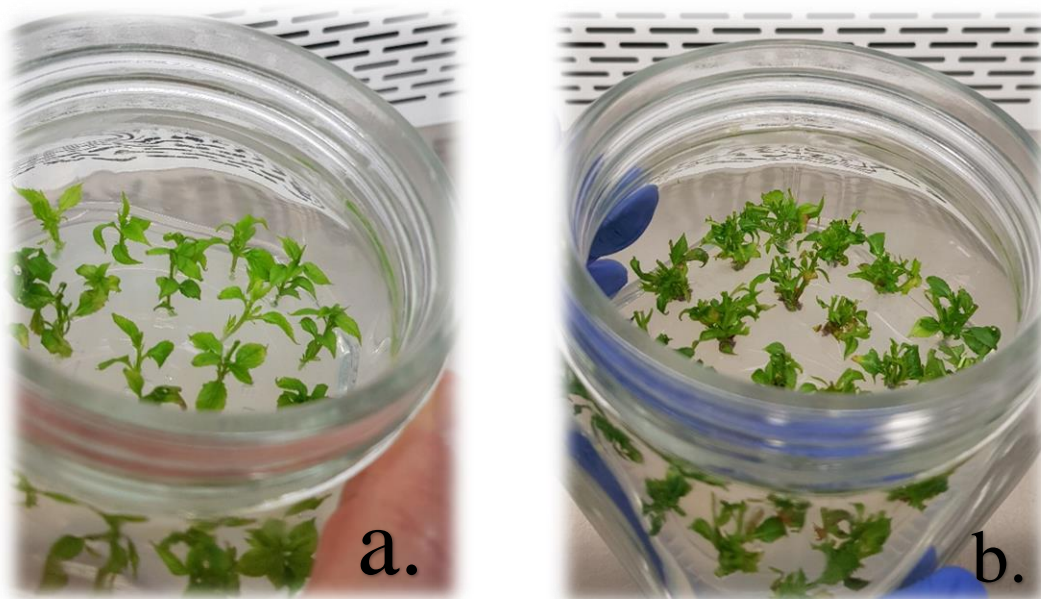
Za uspješnu izradu ovog završnog rada bilo je potrebno temeljito prikupiti, istražiti i proučiti dostupnu literaturu i podatke vezane za mikropropagaciju vegetativne podloge Gisela 6. Dostupna literatura različitih autora usko vezana za kulturu tkiva Gisele 6 u Hrvatskoj je na žalost dosta oskudna. Analizirani su i strani stručni i znanstveni časopisi, razne internetske stranice i dostupni interni podaci s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS), Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* – laboratorij za voćarstvo). U sklopu laboratorija vrše se mnoga *in vitro* istraživanja na raznim voćnim vrstama (malina, goji, orah, borovnica, paulovnja, lijeska, vegetativne podloge za trešnju, višnju, agrume, itd.). Katedra se bavi znanstvenim istraživanjem (razvijanje i poboljšanje protokola u cilju razvoja oplemenjivačkog i selekcijskog rada u voćarstvu), edukacijom studenata, proizvodnjom sadnog materijala i sekundarnih metabolita. Laboratorij posjeduje svu opremu potrebnu za uspješno provođenje mikropropagacije (laminarni stol/kabinet, autoklav, miješalica, pH metar, sterilizator, pincete, skalpeli, teglice, TIB SETIS® sustav bioreaktora, itd.), matični biljni materijal (matičnjak – prijavljen u centru za rasadničarstvo HAPIH), prostor za aklimatizaciju, klima komoru s kontroliranim uvjetima potrebnim za razvoj biljaka u pojedinim fazama mikropropagacije (Slika 3.).

Cilj ovoga završnog rada je ispitati mogućnost mikropropagacije, odnosno organogeneze pojedinih tipova eksplantata vegetativne podloge trešnje Gisela 6 na dva tipa hranjive podloge. Cijeli pokus je postavljen i proveden u sklopu laboratorija za kulturu tkiva na FAZOS tijekom 2020. godine.



Slika 3. Laboratorij za kulturu tkiva - Gisela 6, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

Uspoređivana je organogeneza dva tipa eksplantata: pojedinačni izdanci i baze izdanaka vegetativne podloge trešnje Gisela 6 (slika 4.).



Slika 4. Tip eksplantata u istraživanju – a. (pojedinačni izdanci) i b. (baze izdanaka), FAZOS, (Izvor: Bošnjak, 2020.)

Korištene su dvije vrste hranjivih podloga: DKW (Driver i Kuniyuki, 1984.) i MS (Murashige i Skoog, 1962.) proizvođača Duchefa Biochemie B.V., Nizozemska. Detaljan sastav korištenih hranjivih podloga nalazi se u tablici 2.

Tablica 2. Sastav hranjivih podloga DKW i MS, (Izvor: Duchefa catalogue, 2010-2012.)

MICRO ELEMENTS				MICRO ELEMENTS			
	mg/l	µM			mg/l	µM	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	1.00	DKW	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.11	
FeNaEDTA	44.63	121.61		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.10	
H ₃ BO ₃	4.80	77.63		FeNaEDTA	36.70	100.00	
MnSO ₄ ·H ₂ O	33.80	200.00		H ₃ BO ₃	6.20	100.27	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39	1.61		KI	0.83	5.00	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	17.00	72.19		MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	100.00	
				Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03	
				ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	29.91	
MACRO ELEMENTS					MACRO ELEMENTS		
	mg/l	mM				mg/l	mM
CaCl ₂	112.50	1.01	MS	CaCl ₂	332.02	2.99	
Ca(NO ₃) ₂ ·2H ₂ O	1664.64	8.30		KH ₂ PO ₄	170.00	1.25	
KH ₂ PO ₄	265.00	1.95		KNO ₃	1900.00	18.79	
K ₂ SO ₄	1559.00	8.95		MgSO ₄	180.54	1.50	
MgSO ₄	361.49	3.00		NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61	
NH ₄ NO ₃	1416.00	17.70					
VITAMINS				VITAMINS			
	mg/l	µM			mg/l	µM	
Glycine	2.00	26.64	DKW	Glycine	2.00	26.64	
myo-Inositol	100.00	554.94		myo-Inositol	100.00	554.94	
Nicotinic acid	1.00	8.12		Nicotinic acid	0.50	4.06	
Thiamine HCl	2.00	5.93		Pyridoxine HCl	0.50	2.43	
				Thiamine HCl	0.10	0.30	

Eksplantati vegetativne podloge Gisela 6 nastali su u laboratoriju prijašnjih godina te se na njima provode razna istraživanja druge tematike. U obje podloge dodana je identična koncentracija agara (6.3 g/l), citokinina BAP (0.8 mg/l) i auksina 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. Svi tretmani uključivali su po 25 eksplantata u dvije repeticije (ukupno 8 teglica po 25 eksplantata = 200 eksplantata). Nakon inicijacije eksplantata u aseptičnim uvjetima laminarne komore, svi tretmani (teglice) postavljeni su u režim svjetlosti 16/8 i temperaturu od 24 °C kroz 30 dana.

Nakon 30 dana pristupilo se mjerenju morfoloških parametara i evaluaciji pojedinih tretmana u istraživanju (Slika 5.).

Mjereni su morfološki parametri:

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



Slika 5. Mjerenje morfoloških parametara, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

4. REZULTATI I RASPRAVA

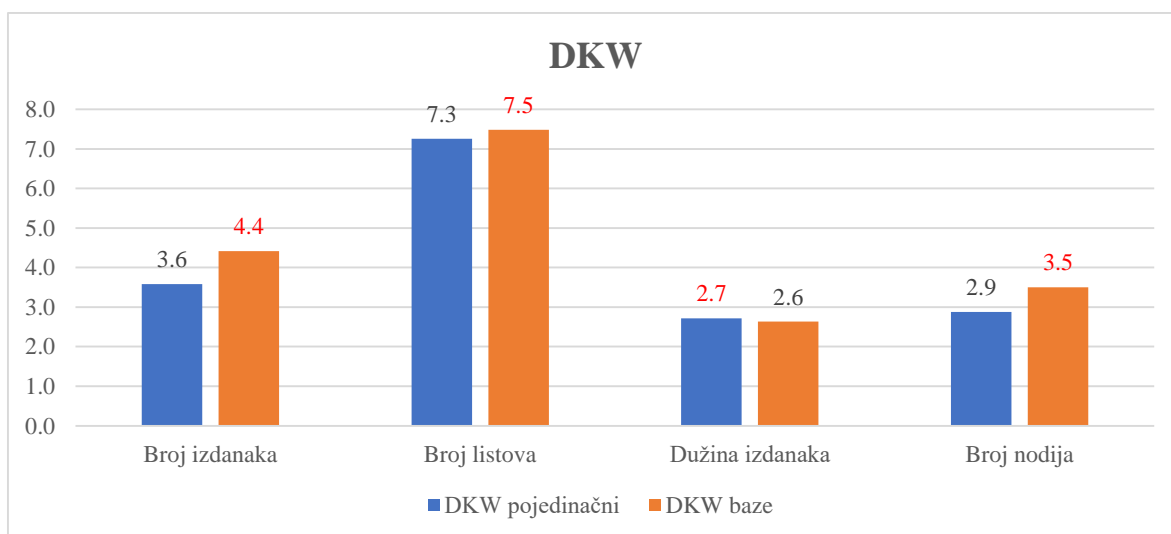
Svi tretmani uspjeli su bez kontaminacije inicirati dovoljno biljne mase potrebne za morfološka mjerenja nakon 30 dana. Nije zabilježen stresni utjecaj hranjive podloge ili uvjeta klima komore kroz period organogeneze (Slika 6.).



Slika 6. Biljna masa nakon 30 dana kulture *in vitro*, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

3.1. Rezultati organogeneze eksplantata na DKW podlozi

Na DKW podlozi (Grafikon 1., Slika 7.) broj izdanaka (4.4), broj listova (7.5) i broj nodija (3.5) bio je veći na eksplantatima, odnosno tretmanu koji uključivao baze izdanaka (DKW baze). Jedino je dužina izdanaka (2.7) bila veća na tretmanu koji je sadržavao eksplantate pojedinačnih izdanaka (DKW pojedinačni).



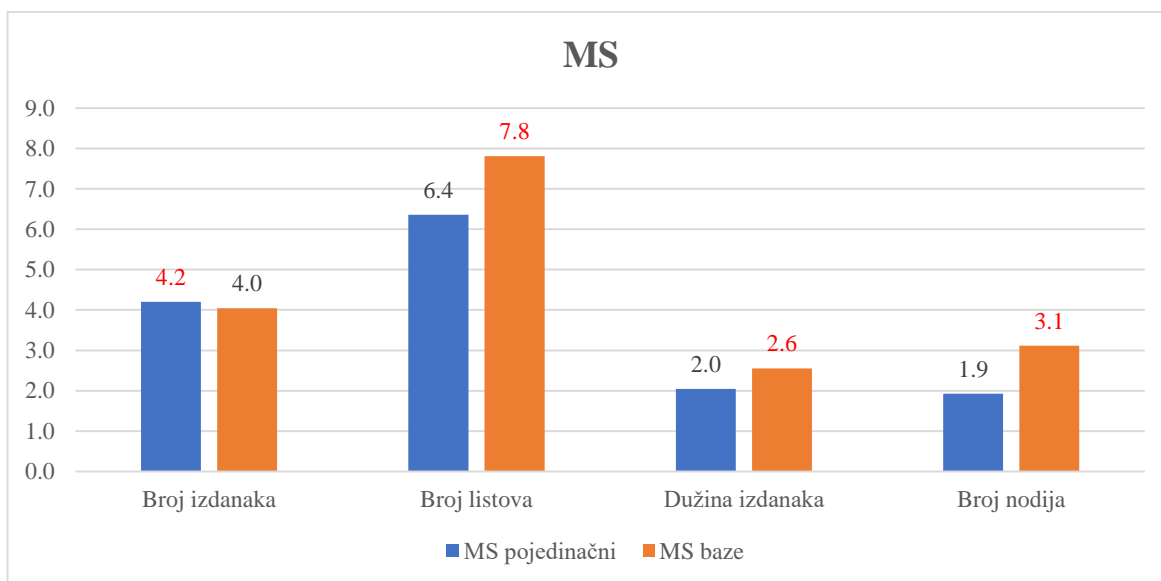
Grafikon 1. Razlike u organogenezi tipa eksplantata na podlozi DKW



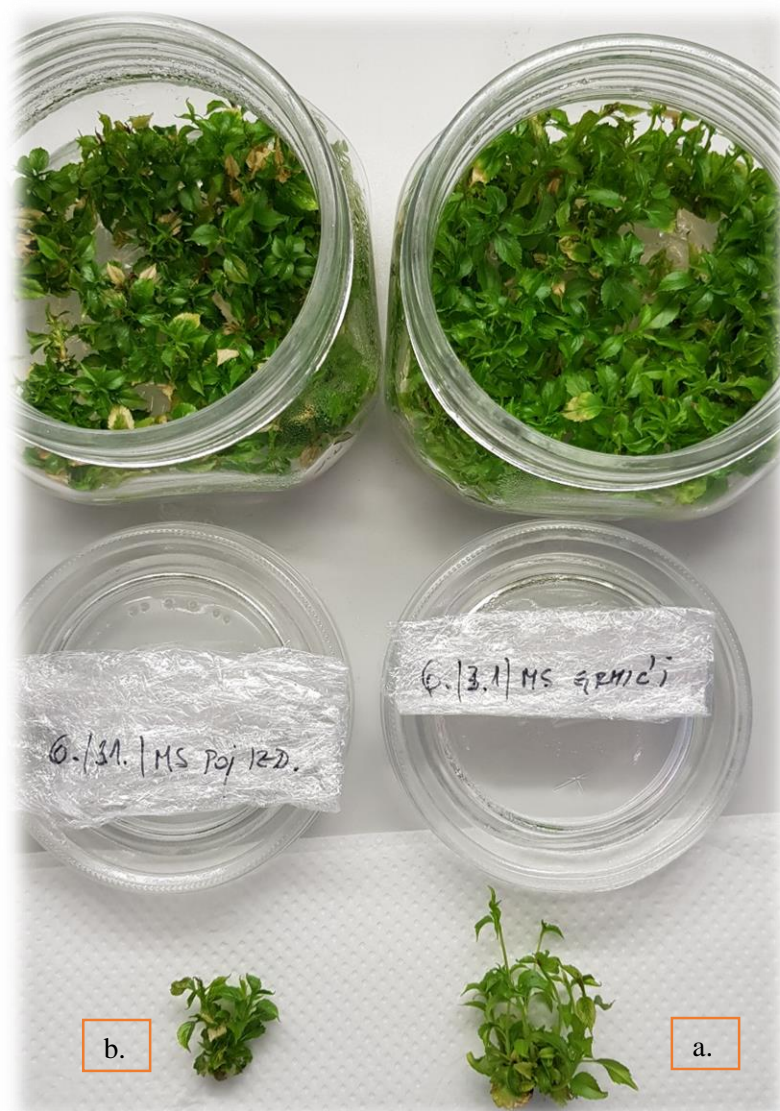
Slika 7. Eksplantati na podlozi DKW – a. baze izdanaka i b. pojedinačni izdanci, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020)

3.2. Rezultati organogeneze eksplantata na MS podlozi

Na MS podlozi (Grafikon 2., Slika 8.), također broj listova (7.8), dužina izdanaka (2.6) i broj nodija (3.1) bila je veća na eksplantatima, odnosno tretmanu koji je uključivao baze izdanaka (MS baze). Jedino je broj izdanaka (4.2) bio veći na tretmanu koji je uključivao pojedinačne izdanke (MS pojedinačni).



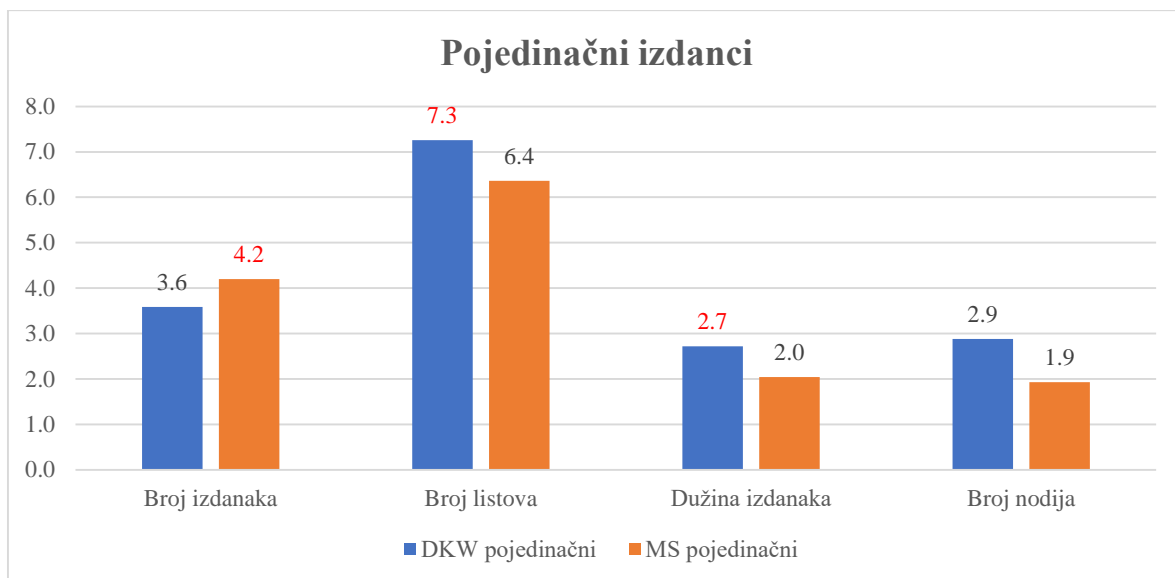
Grafikon 2. Razlike u organogenezi tipa eksplantata na podlozi MS



Slika 8. Eksplantati na podlozi MS – a. baze izdanaka i b. pojedinačni izdanci, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020)

3.3. Razlike između DKW i MS podloge u organogenezi pojedinačnih izdanaka

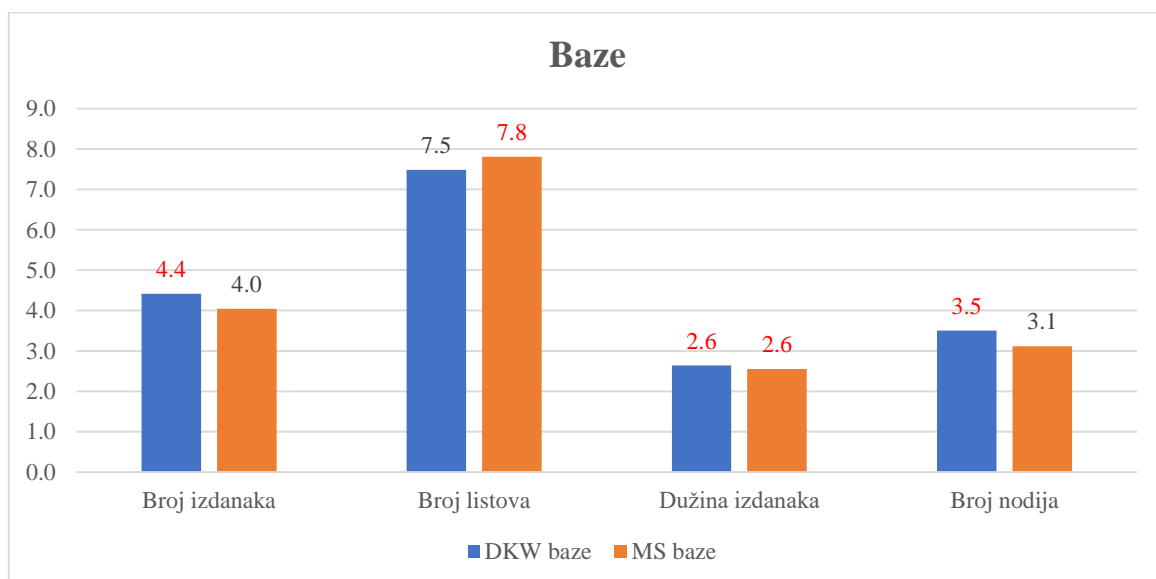
Tretman koji je uključivao hranjivu podlogu DKW i eksplantate pojedinačnih izdanaka inicirao je veći broj listova (7.3), broj nodija (2.9) i dužinu izdanaka (2.7) u odnosu na MS podlogu. Jedino je broj izdanaka (4.2) bio veći na MS podlozi (Grafikon 3.). Iz navedenih rezultata vidljiva je veća učinkovitost DKW podloge u elongaciji novih mikroizdanaka. Ukoliko nam je cilj uključivanje novih mikroizdanaka u daljnu fazu rizogeneze tada dajemo prednost korištenju DKW hranjivog medija.



Grafikon 3. Usporedba korištenih podloga DKW i MS u organogenezi pojedinačnih izdanaka

3.4. Razlike između DKW i MS podloge u organogenezi baza izdanaka

U organogenezi eksplantata, odnosno tretmana koji je uključivao baze izdanaka DKW medij rezultirao je većim brojem izdanaka (4.4) i brojem nodija (3.5) dok je dužina izdanaka (2.6) bila podjednaka na oba korištena medija. Jedino je broj listova (7.8) bio veći na MS mediju (Grafikon 4.).

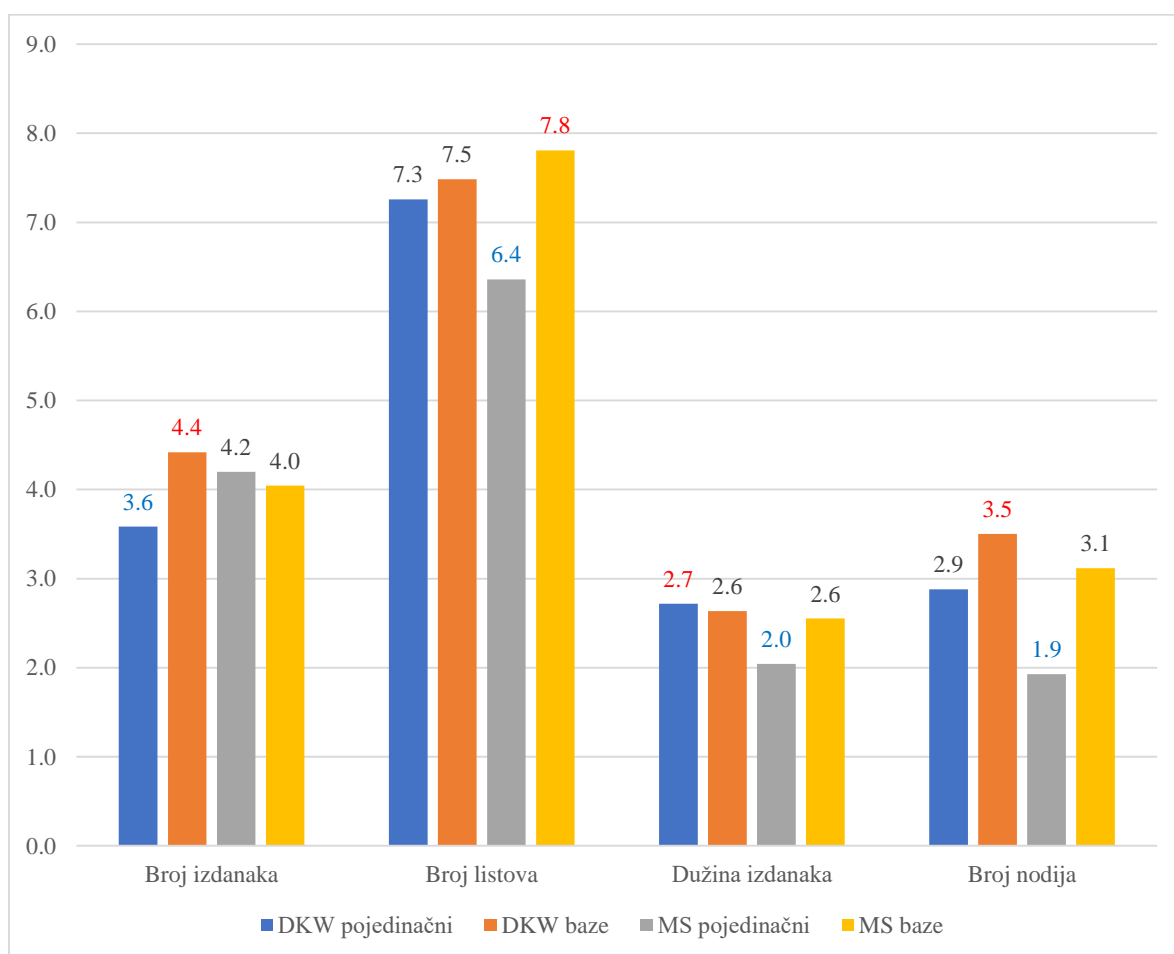


Grafikon 4. Usporedba korištenih podloga DKW i MS u organogenezi baza izdanaka

3.5. Učinkovitost primijenjenih tretmana u organogenezi eksplantata

Na razini cijelog pokusa utvrđen je najveći broj izdanaka (4.4) na tretmanu koji je uključivao baze izdanaka i DKW hranjivi medij, a najmanji na DKW mediju s pojedinačnim izdancima (3.6). Broj listova bio je najveći na MS mediju koji je također uključivao eksplantate s bazama izdanaka (7.8), a najmanji na MS mediju s pojedinačnim izdancima (6.4). Dužina izdanaka bila je najveća na DWK mediju s pojedinačnim izdancima (2.7), a najmanja na MS mediju koji je uključivao pojedinačne izdanke (2.0). Broj nodija bio je najveći na DKW mediju s bazama izdanaka (3.5), a najmanji na MS mediju s pojedinačnim izdancima (1.9).

Kao što je vidljivo iz grafikona 5., najveći broj izdanaka i nodija dobiven je na DKW podlozi koja je uključivala baze izdanaka. Iako dužina izdanaka i broj listova nisu zanemarivi, odnosno tek su za nijansu manji u odnosu na druge primijenjene tretmane. U konačnici obje podloge rezultirale su učinkovito u organogenezi vegetativne podloge za trešnju Gisela 6.



Grafikon 5. Učinkovitost tretmana u organogenezi vegetativne podloge trešnje Gisela 6.

4. ZAKLJUČAK

Na osnovu prethodno iznesenog, može se zaključiti sljedeće:

- ❖ Postoji mogućnosti organogeneze oba tipa eksplantata (pojedinačni izdanci i baze izdanaka) Gisela 6 na obije 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.
- ❖ Na DKW podlozi broj izdanaka, listova i nodija bio je veći pri tretmanu koji je uključivao baze izdanaka.
- ❖ Na MS podlozi broj listova, dužina izdanaka i broj nodija bio je veći pri tretmanu koji je također uključivao baze izdanaka.
- ❖ Tretman koji je uključivao DKW hranjivu podlogu s pojedinačnim izdancima inicirao je duže izdanke s većim brojem listova i nodija u odnosu na MS medij s istim tipom eksplantata.
- ❖ Tretmana koji je uključivao baze izdanaka na DKW mediju rezultirao je većim brojem izdanaka i nodija dok je dužina izdanaka bila podjednaka na oba korištena medija.
- ❖ U konačnici obije podloge rezultirale su učinkovito u organogenezi s malom prednosti DKW podloge koja je uključivala baze izdanaka.
- ❖ Ukoliko nam je cilj uključivanje novih mikroizdanaka u daljnu fazu rizogeneze tada dajemo prednost korištenju DKW hranjivog medija i pojedinačnih izdanaka.
- ❖ Daljnja istraživanja usmjeriti na određivanje učinka određenih vrsta i koncentracija hormona u organogenezi pojedinih eksplantata vegetativne podloge trešnje Gisela 6.

5. POPIS LITERATURE

1. Anonymous, (1997): The Brooks and Olmo register of fruit and nut varieties, third edition, ASHS Press, Alexandria, Virginia, USA, pp.118-131.
2. Balmer, M. (2008): Evaluation of semi-dwarfing rootstocks for sweet cherry orchards in the Rhine river valley (Germany), *Acta Horticulturae*, 795, 203-208.
3. Bhagwat, B., Lane, W.D. (2004): In vitro regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) Lapins and Sweetheart, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78, 173-181.
4. Canil, F.A., Tian, L. (2008): In vitro shoot regeneration from stored mature cotyledons of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars, *Scientia Horticulturae*, 116, 34-40.
5. Cieslinska, M. (2007): Application of thermo- and chemotherapy in vitro for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 15, 117-124.
6. David, H., Domon, J.M., Savy, C., Miannay, N., Sulmont, G., Dargent, R., David, A. (1992): Evidence for early stages of somatic embryo development in a protoplast-derived cell culture of *Prunus avium*, *Physiologia Plantarum*, 85, 301-307.
7. De March, G., Grenier, E., Mnnay, N., Sulmont, G., Davih, H., David, A. (1993): Potential of somatic embryogenesis in *Prunus avium* immature zygotic embryos, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34, 209-215.
8. De Salvador, F.R., Lugli, S. (2002): I portinnesti del ciliegio, *Supplemento a L'Informatore Agrario*, 51, 9-16.
9. Deogratias, J.M., Dosba, F., Lutz, A. (1989): Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic, ringspot virus and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination of chemotherapy, thermotherapy and in vitro culture, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11, 337-342.
10. Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. (1984): In Vitro Propagation of Paradox walnut Rootstock, *Hort. Science*, 19(4).
11. Druart, P. (2013): Micropropagation of *Prunus* species relevant to cherry fruit production, In: *Protocols for micropropagation of selected economically – important horticultural plants*, (Lambardi, M., Ozudogru, E.A., Jain, S.M., eds.), Springer Science + Business Media, New York, pp.119-136.

12. Duchefa Catalogue (2010-2012): Plant Cell and Tissue Culture, Phytopatology, Biochemicals, Duchefa Biochemie B.V., Netherlands
13. Eremin, G.V., Provorčenko, A.V., Gavriš, V.F., Podorožnij, V.N., Eremin, V.G. (2000): Kostočkovie kuljuri: Viruščivanie na klonovih podvojah i sobstvenih kornjak, Feniks, Rostov na Donu, Rusija.
14. Garin, E., Grenier, E., Grenier-De March, G. (1997): Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 48, 83-91.
15. Gella, R., Errea, P. (1998): Application of in vitro therapy for ilarvirus elimination in three *Prunus* species, Journal of Phytopatology, 146, 445-449.
16. Goncalves, B., Moutinhi-Pereira, J., Santos, A., Silva, A.P., Bacelar, E., Correia, C., Rosa, E. (2006): Scion-rootstock interaction affects the physiology and fruit quality of sweet cherry, Tree Physiology, 26, 93-104.
17. Gutierrez-Pesce, P., Taylor, K., Mulleo, R., Rugini, E. (1998): Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic root of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) mediated by pRi 1855 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*, Plant Cell Reports, 17, 574-580.
18. Gutierrez-Pesce, P., Rugini, E. (2004): Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclic secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of transgenic cherry rootstock Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 79, 223-232.
19. Hammatt, N., Grant, N.J. (1998): Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh., (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry), Plant Cell Reports, 17, 526-530.
20. Hofer, M., Hanke, V. (1990): Induction of androgenesis in vitro in apple and sweet cherry, Acta Horticulturae, 280, 333-336.
21. Hofer, M., Hanke, V. (1994): Anther culture of apple and cherry: effect of stage of pollen development-correlative relation with morphological characters of the flower, Gartenbauwissenschaft, 59, 5, 225-228.
22. Howell, W.E., Eastwell, K.C., Li, T.S.C. (2001): Heat treatment, chemotherapy and hydroponic culture for obtaining virus-free trees of sweet cherry, Acta Horticulturae, 550, 455-458.
23. Hrotko, K. (2008): Progress in cherry rootstock research, Acta Horticulturae, 795, 171-178.
24. Ivanicka, J., Petrova, A. (1980): Embryo culture and micropropagation of cherries in vitro. Scientia Horticulturae, 12, 77-82.

25. Jakobek, L., Šeruga, M., Voća, S., Šindrak, Z., Dobričević, N. (2009): Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks, *Scientia Horticulturae*, 123, 23-28.
26. James, D.J., Passey, A.J., Malhorta, S.B. (1984): Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissue of apple and cherry rootstocks, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3, 333-341.
27. Jevremović, S., Radojević, Lj., Druart, P. (2004): Indukcija androgenize u kulturi antera trešnje (*Prunus avium* L.) cv Lapins. Izvodi radova 12. kongresa voćara Srbije i Crne Gore s međunarodnim učešćem, Zlatibor, 29. novembar – 3. decembar 2004, pp.64.
28. Jones, O.P., Gayner, J.A., Watkins, R. (1984): Plant regeneration from callus tissue cultures of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) and the apple rootstock M.25 (*Malus pumila*), *Journal of Horticultural Science*, 59, 463-468.
29. Lugli, S., Bassi, G. (2010): Speciale portinnesti, Ciliegio, *Rivista di Fitticoltura e di Ortofloricoltura*, 72, 7-8, 36-42.
30. Lane, W.D., Cossio, F. (1986): Adventitious shoots from cotyledons of immature cherry and apricot embryos, *Canadian Journal of Plant Science*, 66, 953-959.
31. Long, C.M., Mulinix, C.A., Iezzoni, A.F. (1994): Production of a microspore-derived callus population from sweet cherry, *Hort Science*, 29, 1346-1348.
32. Mandegaran, Z., Roberts, A.V., Hammatt, N. (1999): The ability of *Prunus avium* x *P. pseudocerasus* Colt to form somatic embryos in vitro contrasts with the recalcitrance of *P. avium*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59, 57-63.
33. Matt, A., Jehle, J.A. (2005): In vitro plant regeneration from leaves and internodes section of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.), *Plant Cell Reports*, 24, 468-476.
34. Mazilu, C., Dutu, I., Mladin, G.H., Ancu, S., Coman, M., Rovina, A., Plopa, C. (2013): Achievements and prospects regarding vegetative rootstocks breeding at the Research Institute of Fruit Growing Pitesti, Romania, *Acta Horticulturae*, 981, 407-411.
35. Milatović, D., Nikolić, M., Miletić, N. (2015): Trešnja i višnja, drugo dopunjeno izdanje, Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak.
36. Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
37. Nikolić, D. (2007): Biotehnologija u oplemenjivanju voćaka i vinove loze, Poljoprivredni fakultet Beograd.

38. Ochatt, S.J., Cocking, E.C., Power, J.B. (1987): Isolation, culture and plant regeneration of Colt cherry (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) protoplast, *Plant Science*, 50, 139-143.
39. Ochatt, S.J., Patat-Ochatt, E.M., Rech, E.L., Davey, M.R., Power, J.B. (1989): Somatic hybridization of sexually incompatible top-fruit tree rootstock, wild pear (*Pyrus communis* var *pyraster* L.) and Colt cherry (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*), *Theoretical and Applied Genetics*, 78, 35-41.
40. Perry, R.L. (1987): Cherry rootstocks, In: *Rootstocks for fruit crops*, (Rom, R.C., Carlson, R.F., eds.), John Wiley and Sons Inc., New York, USA, pp.217-264.
41. Quamme, H.A., Brownlee, R.T. (1993): Early performance of micropropagation trees of several *Malus* and *Prunus* cultivars on their own roots, *Canadian Journal of Plant Science*, 73, 847-855.
42. Reidiboyrn-Telleux, L., Diemer, F., Seurdioux, M., Chapelain, K., Grenier-De March, G. (1999): Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*), Effect of maltose and AB supplements, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55, 199-209.
43. Ružić, Đ., Cerović, R. (2003): Primena in vitro metoda kod koštičavih vrsta voćaka, *Jugoslovensko voćarstvo*, 37, 141-142, 37-49.
44. Ružić, Đ., Lazić, T., Kuzmanović, M. (2005): Uticaj različitih izvora i koncentracija ugljenika na mikropropagaciju trešnje (*Prunus avium* L.) cv. Lapins, *Voćarstvo*, 39, 441-451.
45. Snir, I. (1982): In vitro propagation of sweet cherry cultivars, *Hort Science*, 17, 192-193.
46. Stanys, V. (1998): In vitro techniques to increase the output of cherry seedlings from early-ripening parents, *Acta Horticulturae*, 468, 203-208.
47. Tang, H.R., Ren, Z.L., Reustle, G., Krezal, G. (2002): Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars, *Scientia Horticulturae*, 93, 235-244.
48. Takashina, T., Nakano, H., Kato, R. (2003): Efficient plant regeneration culture from leaf explants of in vitro-grown sweet cherry, *Acta Horticulturae*, 622, 123-127.
49. Usenik, V., Fajt, N., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R. (2010): Sweet cherry pomological and biochemical characteristics influenced by rootstock, *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, 4928-4933.
50. Walter, E., Franken-Bembenek, S. (1998): Evaluation of interspecific cherry hybrids as rootstocks for sweet cherries, *Acta Horticulturae*, 468, 285-290.

51. Webster, A.D., Schmidt, H. (1996): Rootstocks for sweet and sour cherries, In: Cherries: crop physiology, production and uses, (Webster, A.D., Looney, N.E. eds.), CAB International, Cambridge, UK, pp.127-163.
52. Yang, H.Y., Schmidt, H. (1994): Influence of different auxins on in vitro rooting of sweet cherry cultivar (*Prunus avium* L.), *Gartenbauwissenschaft*, 59, 45-47
53. Ystaas, J., Froynes, O. (1996): Evaluation of size-controlling rootstocks for Stella and Ulster sweet cherries, *Acta Horticulturae*, 410, 197-204.