Organogeneza eksplantata Oblačinske višnje (Prunus cerasus L.) u kulturi tkiva in vitro

Vračević, Vinko

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:584515

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-27**

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

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Vinko Vračević
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda
Smjer Hortikultura

Organogeneza eksplantata Oblačinske višnje (*Prunus cerasus* L.) u kulturi tkiva *in vitro*

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Vinko Vračević
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda
Smjer Hortikultura

Organogeneza eksplantata Oblačinske višnje (*Prunus cerasus* L.) 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 Oblačinske višnje
(*Prunus cerasus* L.) u kulturi tkiva *in vitro*

Vinko Vračević

Sažetak: Interes novih potencijalnih proizvođača višnje usmjeren je odabiru poznatih i tradicionalnih kultivara našeg uzgojnog područja. Oblačinska višnja predstavlja vodeću sortu višanja u prerađivačkoj industriji Hrvatske. Istraživanje o mogućnosti mikropropagacije, odnosno organogeneze pojedinih tipova eksplantata Oblačinske višnje provedeno je na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (*in vitro* labaratorij za voćarstvo) tijekom 2020. godine. Nakon 30 dana kulture svi tretmani su inicirali dovoljnu biomasu za provođenje morfoloških mjerenja. Rezultati ukazuju na mogućnost organogeneze oba tipa eksplantata. Tretman koji je uključivao baze izdanaka inicirao je veći broj izdanaka i listova u odnosu na tretman s pojedinačnim izdancima. Dokazana je mogućnost organogeneze mikro izdanaka iz aksilarnih pupoljaka pojedinačnog izdanka. Uključivanje pojedinačnih izdanaka u daljnju fazu multiplikacije (umnožavanja) nameće se kao idealno rješenje ukoliko nam je potrebna masovna i brza produkcija sadnog materijala. Buduća istraživanja usmjeriti ispitivanju utjecaja različitih vrsta i koncentracija biljnih regulatora rasta (citokinina i auksina) na pojedine tipove eksplantata, a prvenstveno na pojedinačne izdanke.

Ključne riječi: višnja, Oblačinska, mikropropagacija, organogeneza

27 stranica, 1 tablica, 15 grafikona i slika, 43 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 Agrobiotehnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Horticulture

BSc Thesis

Organogenesis of Oblačinska sour cherry
(*Prunus cerasus* L) explants in tissue culture

Vinko Vračević

Summary: The interest of new sour cherry fruit producer is focused on the selection of well-known and traditional cultivars of our growing area. Cv. Oblačinska is the leading variety of sour cherry in the Croatian fruit industry. Research on the possibility of micropropagation, i.e. organogenesis of different types of cherry explants was conducted at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek (*in vitro* laboratory for fruit growing) during 2020. After 30 days of culture, all treatments initiated adequately biomass to perform morphological measurements. The results indicate possibility of organogenesis both types of explants. The treatment, which included a base shoots initiated larger number of shoots and leaves as compared to treatment with single shoots. The possibility of organogenesis of micro shoots from axillary buds of a single shoot has proven. The inclusion of single shoots in the further phase of multiplication imposed as an ideal solution if we need mass and rapid production of planting material. Future research should be focus on examining the influence of different type and concentrations of plant growth regulators (cytokinins and auxins) on different types of explants, and primarily on single shoots

Keywords: sour cherry, Oblačinska, micropropagation, organogenesis

27 pages, 1 tables, 15 figures, 43 references
BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotehnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotehnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD……....……....1

1.1. Višnja (*Prunus cerasus* L.)……..……...2

1.2. Proizvodnja višnje u svijetu i RH……3

1.3. Razmnožavanje višnje……..……..4

1.3.1. Podjela podloga……5

1.4. Oblačinska višnja….……...7

1.4.1. Morfološke karakteristike Oblačinske višnje……..……...7

1.5. Mikropropagacija – kultura tkiva *in vitro*……..12

1.5.1. Mikropropagacija višnje……...……...13

2. MATERIJAL I METODE.....15

2.1. Labaratorij i oprema……..15

2.2. Opis pokusa i tretmani u istraživanju……16

2.3. Mjerenja u istraživanju…….18

3. REZULTATI I RASPRAVA…….....19

4. ZAKLJUČAK.....23

5. POPIS LITERATURE……..……...……..24

1. UVOD

Višnja (*Prunus cerasus L.*) pripada među najstarije voće u ljudskoj prehrani. Plodovi višnje se koriste na razne načine u preradi, pa se tako od plodova prave sokovi, džem, marmelada, kompot, voćni jogurt, čokoladne bombone, itd. Sortiment višnje je manje dinamičan u odnosu na većinu drugih vrsta voćaka. Procjenjuje se da postoji oko 500 sorti višnje. Također je relativno skroman broj novih sorti koje se stvaraju u svijetu. Prema podacima Državnog zavoda za statistiku ukupna površina pod višnjom u RH tijekom 2018. godine iznosila je 2.220 ha. te je posljednjih godina zapažen trend opadanja površina pod višnjom.

Razmnožavanje višnje je moguće kao i u ostalih voćnih vrsta na dva načina: vegetativno (pomoću vegetativnih organa) i generativno (pomoću sjemena). Oblačinska višnja se vrlo lako razmnožava pomoću korijenovih izdanaka. Jedna od suvremenih tehnika vegetativnog razmnožavanja je mikropropagacija, odnosno kultura tkiva *in vitro*. Kultura biljnog tkiva (mikropropagacija) je metoda koji omogućava brzu proizvodnju velikog broja genetski jednakih biljaka na relativno malom prostoru u kratkom vremenskom periodu neovisno o dinamici sezone.

Posljednjih godina uslijed politike poticanja i mjera u ruralnom razvoju RH (poljoprivredni projekti) došlo je do povećanog interesa novih potencijalnih poljoprivrednih proizvođača za ovom voćnom kulturom. Iskazan je veliki interes za podizanjem novih nasada višnje gdje se kultivar Oblačinska višnja vrlo često navodi kao glavni sortiment nasada. Uslijed navedenog došlo je i do povećane potrebe za certificiranim i fitosanitarno ispravnim sadnim materijalom. U ovom momentu upravo se mikropropagacija – kultura tkiva *in vitro* nameće kao idealno rješenje u brzoj produkciji sadnog materijala za tržište RH.

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati mogućnost mikropropagacije, odnosno organogeneze pojedinih tipova eksplantata Oblačinske višnje *in vitro*.

1.1. Višnja (*Prunus cerasus* L.)

Višnja (*Prunus cerasus L.*) pripada u najstarije voće koje čovjek koristi, što potvrđuju ostaci koštica špiljskih ljudi iz Sjeverne Amerike i sa Skandinavskog poluotoka, koji ukazuju na postojanje ove vrste još u vrijeme neolitika (prije skoro 5000 godina). (Brown i sur., 1996.) Smatra se da je višnja nastala spontanom hibridizacijom između stepske višnje (*Prunus fruticosa* Pall.) i divlje trešnje (*Prunus avium* L.). Višnja pripada porodici *Rosaceae*, potporodici *Prunoideae* i rodu *Prunus* L., podrodu *Cerasus* Pers. i sekciji *Eucerasus Koehne*. (Rehder, 1974.)

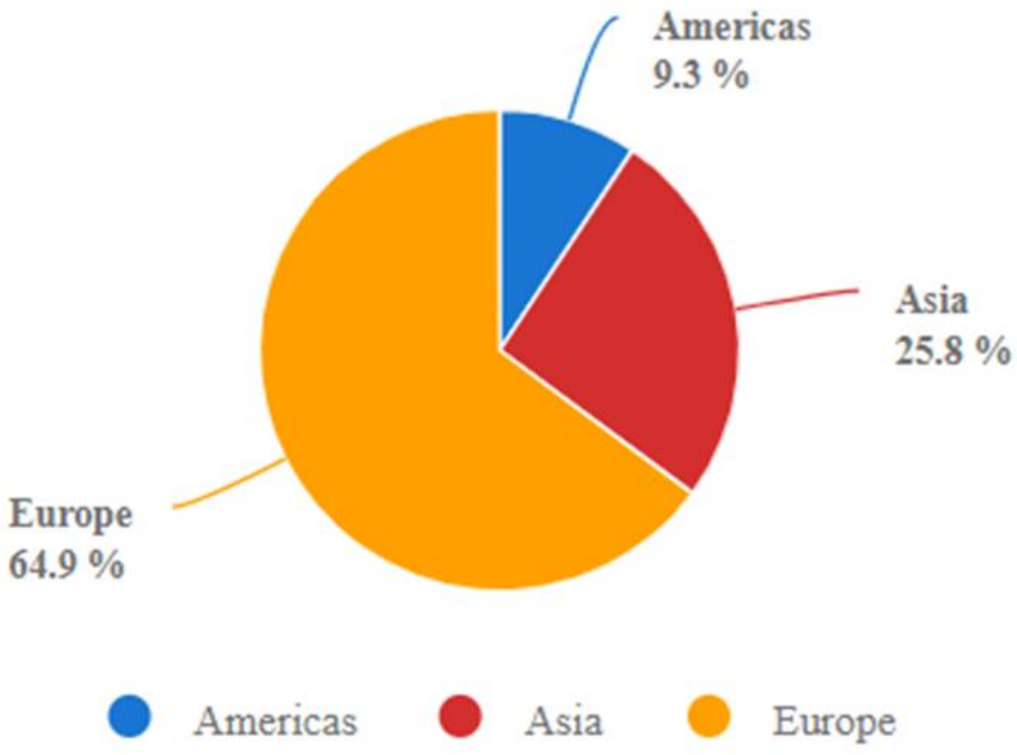
Relativno je jednostavna za uzgoj. Oblačinska višnja, koja je na našem području poprilično zastupljena se lako vegetativno multiplicira, tako da je proizvodnja sadnica jednostavna te su i sadnice jeftine. Uz sve to, stabla višnje vrlo brzo stupaju u rod, rode redovno i obilato, rezidba nije kompliciranа te nije potreban velik broj zaštitnih prskanja, a i berba se može izvoditi strojno. Višnja je izrazito otporna na niske temperature i može uspjeti i na većim nadmorskim visinama, čak i do 1500 m.

Plodovi višnje se koriste za razne načine prerade, pa se tako u industriji od plodova prave sokovi, džem, marmelada, kompot, voćni jogurt, čokoladne bombone. No uz sve to plodovi višnje se koriste za smrzavanje i sušenje. Također od plodova se nerijetko rade i alkoholna pića, ako što su likeri i višnjevac. Na posebnoj cijeni je liker „Maraschino“ koji se proizvodi u Dalmaciji destilacijom ploda i lista višnje Maraske. U kulinarstvu se pak višnje koriste za pravljenje pita, kolača, torti, sladoleda. Koštice višnje koje ostaju kao otpaci nakon prerade plodova se mogu koristiti za proizvodnju aktivnog ugljena, koji je dobre kvalitete. (Luissier i sur., 1994.). Cvjetovi višnje imaju značajan utjecaj kod stvaranja meda, te se prinos meda po hektru kreće oko 30 kg (Jašmak, 1980.).

Sortiment višnje je manje dinamičan u odnosu na većinu drugih vrsta voćaka. Točan broj sorti višnje u svijetu nije poznat, ali je on definitivno znatno manji u odnosu na trešnju. Procjenjuje se da postoji oko 500 sorti višnje. Također je relativno skroman broj novih sorti koje se stvaraju u svijetu. Najviše novih sorti je stvoreno u Rusiji, Ukrajini, Poljskoj, Rumunjskoj, Mađarskoj i Njemačkoj (Milatović i sur., 2011).

1.2. Proizvodnja višnje u svijetu i RH

Na globalnoj razini, u 2018.godini ukupna proizvodnja višanja je iznosila 1.529.000 tona, od čega se 64.9% odnosi na Europu (Grafikon 1.) na ukupnoj površini od 215.839 ha, što dovodi do prosjeka od 7.09 t/ha. Najveća tri svjetska proizvođača su Rusija s 232.200 t, Ukrajina s 218.700 t te Poljska 200.632 t (FAOSTAT, 2018.). Što se pak tiče Hrvatske, prema podacima Državnog zavoda za statistiku ukupna proizvodnja višanja u 2018.godini je bila 8.301 tona na površini od 2.220 ha, što bi značilo 3.74 t/ha, dok se već u 2019. godini bilježi značajan pad ukupne proizvodnje za čak 30.3 % te ona iznosi 5.867 tona. Površine proizvodnje višanja u Osječko-baranjskoj županiji se iz godine u godinu smanjuju, konkretno prema podacima Agencije za plaćanje u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju, 2016.godine je bilo 883.62 ha, već naredne godine to je bilo 824.99 ha, a 2018.godine 817 ha nasada višnje.



Grafikon 1. Proizvodnja višnje po kontinentima,
(Izvor: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize)

1.3. Razmnožavanje višnje

Razmnožavanje višnje je moguće kao i u ostalih voćnih vrsta na dva načina: vegetativno (pomoću vegetativnih organa) i generativno (pomoću sjemena).

Kod generativnog razmnožavanja dobiva se potomstvo koje je heterogeno i nema iste osobine kao matična biljka. Zbog te osobine se sorte višnje ne mogu razmnožavati sjemenom, već se generativno razmnožavanje koristi pri stvaranju novih sorti putem hibridizacije te pri proizvodnji generativnih podloga.

Vegetativnim razmnožavanjem se pak dobiva homogeno potomstvo, koje je po svojim osobinama identično matičnoj biljci. Postoje 2 tipa vegetativnog razmnožavanja, a to su: cijepljenje i razmnožavanje na vlastitom korijenu.

Razmnožavanje na vlastitom korijenu se vrši pomoću izdanaka, reznica, nagrtanjem ili mikropropagacijom. Pri čemu je poznato da se većina sorti višnje vrlo teško razmnožava na ovaj način, tako da on nema znatan utjecaj za proizvodnju sadnica. Izuzetak predstavljaju tek neke sorte višnje kao što je između ostalih Oblačinska, koja se razmnožava pomoću izdanaka. Cijepljenje, navrtanje ili transplantacija predstavlja spajanje dvije komponente: podloge i plemke u novu biljku. Podloga je donji dio cijepa koji vrši ulogu korijena, a plemka je gornji dio cijepa koji vrši ulogu stabla. Ovaj način razmnožavanja predstavlja najznačajniji način u proizvodnji sadnica višnje.

Hrotko (2008.) je utvrdio da programi oplemenjivanja podloga za trešnju i višnju postoje u 17 zemalja i da je u okviru njih stvoreno više od 100 novih podloga. Od toga najveći broj čine međuvrsni hibridi (42) i podloge nastale od *P. cerasus* (41), dok znatno manje podloga potječe od *P. avium* i *P. mahaleb* (po 12). Ciljevi oplemenjivanja podloga za trešnju i višnju su sljedeći:

- Slaba do umjerena bujnost
- Dobar afinitet sa sortama trešnje i višnje
- Ranije stupanje u rod i visoka rodnost cijepljenih sorti
- Otpornost na niske temperature

- Prilagođenost različitim tipovima tla
- Otpornost na uzročnike bolesti i štetočine
- Što veća uniformnost osobina
- Dobro ukorjenjivanje na stalnom mjestu
- Bez stvaranja izdanaka
- Dobra kvaliteta ploda cijepljenih sorti

Kod generativnih podloga je važno da sjeme ima dobru klijavost, da sijanci budu vitalni te da ne formiraju bočne grančice u zoni cijepljenja. Što se tiče pak vegetativnih podloga bitno je da se lako multipliciraju.

1.3.1. Podjela podloga

Danas u svijetu postoji veliki broj podloga koje se koriste za proizvodnju sadnica trešnje i višnje. Prema porijeklu ih dijelimo na generativne i vegetativne podloge. Što se pak tiče sadnica same višnje više se koriste generativne podloge. Prema Krpini i sur. (2004.) višnja koja se uzgaja u kontinentalnoj RH i na suhim tlima u Dalmaciji uglavnom je uzgojena na sjemenjaku rašeljke (*Prunus mahaleb* L.)

Generativne podloge koje se danas ističu kao najzastupljenije su: divlja trešnja (*Prunus avium* L.*),* rašeljka *(Prunus mahaleb* L.*)* i obična višnja *(Prunus cerasus* L.*).*

Divlja trešnja još poznata kao vrapčara je najviše korištena podloga za trešnju u svijetu i kod nas, a također se koristi i kao podloga za višnju. Najviše joj odgovaraju duboka, plodna i dobro drenirana tla, te upravo ta tla bolje podnosi od magrive. Podloga razvija dobro razgranat i snažan korijenov sustav, te nije sklona formiranju izdanaka. Pogodna je podloga za uzgoj trešanja i višanja u slobodnom porastu sa visokim ili poluvisokim deblom. Podloga je vrlo tolerantna na *Phytophtora spp.* i *Armillaria mellea,* dok je s druge strane osjetljiva na *Pseudomonas spp., Verticillium spp.* i *Agrobacterium tumefaciens* te je također osjetljiva na

uzročnika pjegavosti lista (*Blumeriella jaapii*). Dobra je generativna podloga za trešnju, dok je za višnju pak zadovoljavajuća.

Magriva još poznata kao rašeljka se od davnih vremena prakticira kao podloga za uzgoj trešanja i višanja. Najrasprostranjenija je u mediteranskom području. Najbolje uspijeva na lakšim, rastresitim i dobro dreniranim tlima te također dobro podnosi skeletna, kamenita, pjeskovita i šljunčana tla. Otporna je na poveći sadržaj vapna u tlu i sušu te samim time ne podnosi teška tla i visok nivo podzemne vode ili suvišne vlage u tlu. Nije pogodna za sadnju na mjestima gdje je nedavno iskrčen voćnjak. Korijenov sustav podnosi temperature do -15 °C te je tolerantan na bakterijski rak *Pseudomonas spp.,* a osjetljiv na *Phytophtora spp., Armillaria mellea* i *Verticillium spp.).* Što se tiče raka korijena *Agrobacterium tumefaciens* podloga je umjereno osjetljiva, no znatno manje nego divlja trešnja, dok je s druge strane tolerantnija na uzročnika pjegavosti lista *Blumeriella jaapii.* Sadnice magrive su veoma neujednačene što se vodi kao glavni nedostatak podloge, rastu znatno brže od sijanaca divlje trešnje te često dostižu debljinu potrebnu za cijepljenje već u prvoj godini. Sorte trešnje i višnje koje se cijepe na ovoj podlozi su manje bujne od onih na podlozi divlje trešnje, čak nekih 10 - 20 %. I one ranije dolaze u rod, rodnije su te imaju kraći životni vijek. Plodovi su pak nešto krupniji te imaju veću vrijednost suhe tvari.

Obična višnja je podloga koja je najviše rasprostranjena na području jugoistočne Europe i jugozapadne Azije. Ističe se time što raste kao grm ili manje drvo visine do 6 m, korijenov sustav za razliku od magrive i divlje trešnje se manje razvija u dubinu te je razgranatiji. Ne podnosi suha tla s većim sadržajem vapna, već se bolje razvija na teškim i važnim tlima. Otpornija je na mraz od magrive i divlje trešnje, dok se osobine popust slabijeg ukorjenjivanja te formiranje značajnog broja korijenovih izdanaka vode kao glavni nedostaci ove podloge.

1.4. Oblačinska višnja

Oblačinska višnja je autohtona i heterogena srpska sorta koja je dobila ime po malom selu Oblačina u južnoj Srbiji. Postojeća populacija je razvijena korištenjem različitih vrsta razmnožavanja kao što je zapercima i sjemenom. Također primijećeno je varijabilnost intrakultivara uzrokovana prirodnim mutagenim faktorima. (Mišić, 1989.). Ta sorta predstavlja mješavinu velikog broja genotipova, zbog čega nastaju problemi prilikom njihova razmnožavanja i iskorištavanja. Upravo ti razlozi, zbog metoda uzgoja izazivaju poseban oprez prilikom odabira genotipova (Nikolić i sur., 2005.). Oblačinska višnja predstavlja vodeću sortu višanja za prerađivačku industriju u Hrvatskoj zbog svojih pomoloških karakteristika, pogodnosti za strojnu berbu te rane zrelosti i dobre plodnosti. (Jurković i sur., 2008.). S obzirom na nutritivne vrijednosti Oblačinske višnje pri čemu se ističe značajan izvor antioksidanata, uključujući i antocijanine i spojeve polifenola koji su uključeni u antioksidativnu borbu protiv biotskog i abiotskog stresa, ima pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi te je vrlo popularna kao voćni nasad (Viljevac i sur., 2012.).

1.4.1. Morfološke karakteristike Oblačinske višnje

Morfologija se bavi proučavanjem oblika, građe i funkcije pojedinih organa. Organi višnje se dijele na vegetativne i generativne. Vegetativni organi su korijen, stablo i list te prvenstveno služe za održavanje života jedinke. Stablo višnje je podijeljeno na dva dijela: deblo i krošnju, pri čemu se krošnja sastoji od grana i grančica i na sebi nosi pupove, listove, cvjetove i plodove. Generativni ili reproduktivni organi su cvijet, plod i koštica, a njihova osnovna uloga je opstanak vrste (Milatović i sur., 2011.).

Korijen je vegetativni organ čiji je rast neograničen s vrhom u tlu. Osnovna uloga mu je pričvršćivanje voćke u tlo te apsorpcija vode i u njoj otopljenih mineralnih tvari. Također služi za skladištenje rezervnih hranjivih tvari kao što su škrob, bjelančevine i masti. Prema porijeklu može biti generativni ili pravi koji potiče od klice i glavna masa tog korijenja je na dubini 40 - 80 cm, s druge strane vegetativni ili adventivni korijen potiče iz adventivnih pupova stabla ili korijena te se njegova glavna masa nalazi na 20 - 50 cm.

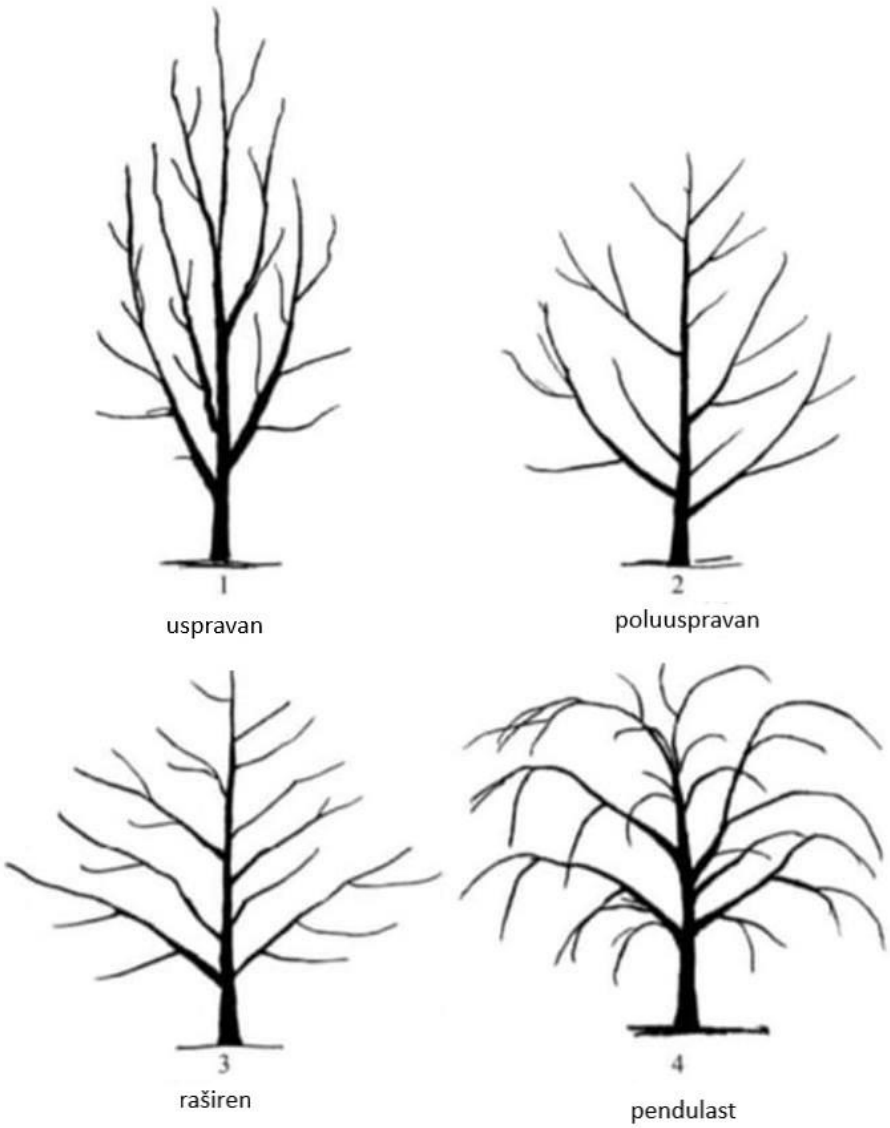
Deblo je dio stabla koji se nalazi između korijenovog vrata i prve skeletne grane. Njegove glavne uloge su da nosi krošnju te je održava u uspravnom položaju koji je najprikladniji za maksimalno korištenje sunčeve svjetlosti, također provodi ascedentno mineralne tvari iz korijena u krošnju i descedentno organske tvari iz listova dolje ka korijenju te vrši skladištenje rezervnih hranjivih tvari. Kora debla je tanka, glatka, sivo-smeđe boje s velikim izduženim lenticelama. (Slika 1.) Karakteristična visina debla kod višnje koja se bere posebnom mehanizacijom je 80 - 100 cm.

Slika 1. Deblo Oblačinske višnje (Izvor: Vračević, 2020.)

Krošnja predstavlja dio stabla koji je razgranat. Sastoji se od skeletnih i poluskeletnih grana i obraslih grančica. Produžnica debla ili centralna grana se naziva provodnica. Iz nje izrastaju grane I. reda tzv. osnovne ili skeletne, potom se iz njih razvijaju grane II. reda , pa iz njih grane III. reda (poluskeletne) te tako sve do grana iz X. reda koje su moguće u starijim voćnjacima. Višnja karakterizira gusta, razgranata krošnja s velikim borjem tankih grančica,

koje su često povijene. Prema UPOV deskriptoru (2006. i 2007.) postoje četiri osnovna oblika krošnje višnje (Slika 2.) :

1. Uspravan (upright)
2. Poluuspravan (semi-upright)
3. Raširen (spreading)
4. Pendulast (dropping)



Slika 2. Oblici krošnje višnje (Izvor: https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg230.pdf)

Rodne grančice se kod višanja dijele na 3 tipa a to su:

1. Majski buketići (majske kitice)
2. Kratke rodne grančice
3. Duge (vite) rodne grančice

Pupovi predstavljaju točke rasta voćaka. Podjela prema položaju: terminalni ili vršni koji se formiraju na vrhu i lateralni ili bočni koji se formiraju u pazušcu lista. Osim te podjele još ima i prema funkciji na vegetativne i generativne. Pri čemu se vegetativni dijele na drvne, lisne i latentne odnosno spavajuće i adventivne pupove. Iz adventivnih pupova korijena razvijaju se izdanci, a iz stabla izbojci. Dok su generativni pupovi tzv. reproduktivni ili cvjetni te su mnogo krupniji i zaobljenijeg oblika nego vegetativni. Iz jednog cvjetnog pupa se najčešće razvija 2 - 4 cvijeta.

List (Slika 3.) je osnovni vegetativni organ svake biljke, koji ima ograničen rast. U njemu se odvijaju procesi fotosinteze, disanja i transpiracije. Listovi višnje su sitniji, širi i kraći, uspravni s tanjom peteljkom i obično nemaju lisne žlijezde. Listovi po pravilu opadaju u jesen po završetku vegetacije, osim ako ih napadne neki štetnik ili uzročnik bolesti zbog kojeg list može opasti i u tijeku vegetacije. Oblik lista može biti lancetast, eliptičan i široko eliptičan. Fotirić (2009.) navodi da Oblačinska višnja ima sitan do srednje krupan list sa prosječnom površinom oko 26 cm^2.

Cvijet (Slika 3.) je skraćeni ne razgranati izdanaka koji ima ograničen rast, listovi su mu preobraženi radi spolnog razmnožavanja. Višnja ima dvospolni cvijet jer se u istom cvijetu nalaze i prašnici i tučak.

Slika 3. Cvijet i list Oblačinske višnje (Izvor: Vračević, 2020)

Plod je generativni organ koji se poslije oplodnje razvija iz plodnice tučka, njegova biološka uloga je da štiti sjeme do sazrijevanja i doprinosi njegovom širenju. On predstavlja jestivi dio (Slika 4.) voćke te se koristi kao hrana u svježem ili prerađenom obliku. Botanički tip ploda kod višnje je koštunica. Koštunica je po tipu monokarpna, jer je perikarp izgrađen od jednog oplodnog listića. Perikarp je jasno podijeljen na tri sloja, a to su egzokarp ili pokožica, mezokarp ili meso te endokarp ili koštica.

Slika 4. Plod Oblačinske višnje (Izvor: Vračević, 2020)

1.5. Mikropropagacija – kultura tkiva *in vitro*

Mikropropagacija je vegetativno umnožavanje biljaka *in vitro* od dijelova izdanaka. Pri tome se regeneracija biljaka vrši preko formiranja aksilarnih pupova (vršni ili bočni). Kao eksplantati za mikropropagaciju se najčešće koriste: vršni meristemi izdanaka, vrhovi izdanka ili nodijalni segmenti.

Prednosti mikropropagacije u odnosu na standardne načine razmnožavanja su:

1. Brzo razmnožavanje klonova koje se ne može ostvariti drugim standardnim metodama razmnožavanja i dobivanje uniformnog sadnog materijala.
2. Može se koristiti kod biljaka koje se teško razmnožavaju drugim načinima vegetativnog razmnožavanja..
3. Dobivanje biljaka oslobođenih od virusa.
4. Dugo čuvanje klonskog materijala putem tehnika „cold storage“ i krioprezervacije.
5. Postupak razmnožavanja se provodi tijekom cijele godine u laboratorijskim uvjetima nezavisno od vanjskih uvjeta.
6. Lako je prenošenje materijala na velike udaljenosti.
7. Dobivanje velikog broja biljaka od jednog početnog eksplantata, tako da je proizvodnja neograničena i bez mogućnosti zaraze.

Što se pak tiče nedostataka ove metode, izdvajaju se: skupa laboratorijska oprema, pojava nepoželjnih mutanata i njihovo nekontrolirano umnožavanje, a također može doći i do pojave nepoznatih patogena uz rizik plasmana velikih serija sadnog materijala. Mediji koji se koriste u procesu mikropropagacije uglavnom se sastoje iz neorganskih soli makro i mikroelemenata, organskih komponenata (fitohormoni, vitamini), izvora ugljika (saharoza, sorbitol) i agara za učvršćivanje medija (Keserović i sur., 2016.).

Kultura biljnog tkiva (mikropropagacija) je alat koji omogućava brzu proizvodnju velikog broja genetski jednakih biljaka koristeći relativno mali prostor, početni materijal i vrijeme (Odutayo i sur., 2004.). Metoda mikropropagacije je razvijena u svrhu brzog razmnožavanja, jer je konvencionalno razmnožavanje voćnih vrsta vrlo sporo i skupo. Stoga se mikropropagacija ističe kao dobra metoda za proizvodnju zdravog biljnog materijala na vlastitom korijenu u kratkom vremenu. *In vitro* razmnožavanje se sastoji od sljedećih faza: odabir eksplantata, uspostavljanje aseptične (sterilne) kulture, multiplikacija, ukorjenjivanje

i aklimatizacija biljaka. Najvažniji korak za uspostavljanje aseptične kulture je sterilizacija eksplantata, uspješnost kulture tkiva svih biljnih vrsta ovisi o uklanjanju egzogenih i endogenih kontaminirajućih mikroorganizama (Constantinem, 1986.; Buckley i Reed, 1994.) *In vitro* kontaminacija gljivicama, bakterijama i kvascima vrlo je aktualna istraživačka tema u laboratorijima za kulturu biljnog tkiva. Kontaminirane biljke mogu smanjiti stopu razmnožavanja i ukorjenjivanja ili mogu jednostavno odumrijeti. Potrebno je ukloniti strane onečišćivače, uključujući bakterije i gljivice iz eksplantata i vrlo je teško dobiti sterilni biljni materijal potpuno sterilan bez onečišćenja. Pogotovo je to problematično kada se koristi odrvenjeli biljni materijal (Niedz i Bausher, 2002.) Površine živih biljnih materijala su prirodno onečišćene mikroorganizmima iz okoliša, pa je površinska sterilizacija eksplantata u kemijskim otopinama ključni korak u pripremi. Dezinfekcijska sredstva koja se koriste su: natrijev hipoklorit, kalcijev hipoklorit, etanol, živin klorid, vodikov peroksid i srebro nitrat. Većina laboratorija koristi natrijev ili kalcijev hipoklorit za površinsku sterilizaciju eksplantata. Budući da su ta sredstva toksična za biljno tkivo, kontaminacija mora biti uklonjena bez oštećenja biljnih stanica. Različite infekcije mogu utjecati na promjenjivi rast, nekrozu tkiva, smanjenje proliferacije i pucanja korijena (George, 1993.). Metode za smanjenje kontaminacije uključuju upotrebu eksplantata biljaka donora pod strogim sanitarnim režimom, učinkovitu sterilizaciju početnih eksplantata i smanjenje veličine početnih eksplantata samo na apikalni meristem. Teško je odrediti standardne postupke sterilizacije koji bi bio primjenjiv na sve biljke (Mihaljević i sur., 2013.a).

1.5.1. Mikropropagacija višnje

Postupak mikropropagacije kod voćaka je razrađen u toku 70-ih godina 20-og stoljeća, a kod višnje ima najveću primjenu u proizvodnji vegetativnih podloga. Tako se jedna od najznačajnijih vegetativnih podloga za trešnju i višnju, Gizela 5 razmnožava isključivo ovom metodom (Ružić i Cerović, 2003.). Osim podloga, mikropropagacija je korištena i kod raznih divljih vrsta trešnje i višnje: *Prunus avium* (Hammat i Grant, 1997.; Ďurkovič, 2006.), *Prunus fructicosa i Prunus tomentosa* (Pruski i sur., 2005.). Generalno gledano, kod voćaka dobivenih mikropropagacijom uočava se veća bujnost i veći prinos (Ružić i Cerović, 2003.). Varijabilnost germplazme u višnji predstavlja bogat izvor raznolikosti za uzgajivače (Radičević i sur., 2012.). Balkanski poluotok jedno je od najvrjednijih sekundarnih središta

genetske raznolikosti i pruža neiscrpni genski bazen za oplemenjivački rad u *Prunus sp*. (Ognjanov i sur., 2009.; Bošnjaković i sur., 2012.). Populacijska heterogenost uzrokuje velike probleme u razmnožavanju, a odabir i izoliranje klonova s najpovoljnijim karakteristikama zahtijeva rad (Nikolić i sur., 2005.; Miletić i sur., 2008.). Nije objavljena učinkovita vegetativna metoda razmnožavanja za *P. cerasus* L., uključujući „Oblačinsku" višnju, otkako je glavna metoda razmnožavanja putem korijenovog izdanaka i sjemenki. Protokoli za mikropropagaciju predstavljeni su na Gisela 5 (Vujović i sur., 2012.), Gisela 6 (Vujović i sur., 2009; Hossini i sur., 2010.), PHL-A (Sedlak i sur., 2008; Mahdavian i sur., 2011.) i sortama višnje (Cerović i Ružić, 1987.). Zasluga korištenja *in vitro* meristema, vrhova izdanaka ili pupova u uzgoju podloga, kao načina razmnožavanja je u tome što je početni izdanak već *in vivo* diferenciran. U isto vrijeme, kao sredstvo očuvanja germplazme, osigurava dostupnost genetskog materijala kako se ukaže potreba. Na biljne vrste s određenim vremenom spavanja, na uspjeh uspostave kulture utječe sezona tijekom koje se dobivaju eksplantati (Preece, 2008.). Vrlo važna prednost uvođenja *in vitro* germplazme u uzgoj podloga je potencijal za oporavak biljaka bez virusa iz zaražene germplazme kroz izdanke meristemske kulture (Druart, 2013.).

Ugljikohidrati igraju važnu ulogu u kulturi tkiva *in vitro* kao izvor energije, ugljika i kao osmotski agens (George i sur., 2008.). Šećer je vrlo važna komponenta u mediju, a njegov dodatak je ključan za *in vitro* rast i razvoj biljaka jer fotosinteza nije dovoljna zbog rasta koji se odvija u uvjetima neprikladnim za fotosintezu (Pierik, 1987.). Pokretanje i rast korijena su procesi koji zahtijevaju velike količine energije i mogu se dogoditi samo na štetu raspoloživih metaboličkih komponenti, a to su uglavnom ugljikohidrati (Custodio, 2004). U staničnoj kulturi obično se upotrebljava saharoza ili glukoza od 2-5%. Mogu se koristiti i drugi izvori ugljikohidrata, poput fruktoze, maltoze, sorbitola i škroba (Smith, 2000.). Budući da ne postoji istraživanje o *in vitro* razmnožavanju višnje cv. Oblačinska, Mihaljević i sur. (2013.b) iznose rezultate učinka fruktoze, glukoze, saharoze i sorbitola. Najveća stopa ukorjenjivanja s najvećim broje korjenčića postignuto je na mediju sa saharozom, a najlošija na mediju sa sorbitolom. Čini se da je u mnogim biljnim vrstama odgovor kulture na različite ugljikohidrate u određenoj mjeri ovisan o genotipu (Cuenca i Vietiez, 2000.). Rezultati pokazuju da je saharoza najbolji izvor ugljika za ukorjenjivanje Oblačinske višnje s optimalnom stopom ukorjenjivanja, optimalnim brojem i duljinom korijena za komercijalnu proizvodnju. Taj rad je prvo izvješće o utjecaju izvora, vrste i koncentracije ugljika na ukorjenjivanje višnje i pruža osnovu za poboljšanje mikropropagacije Oblačinske višnje.

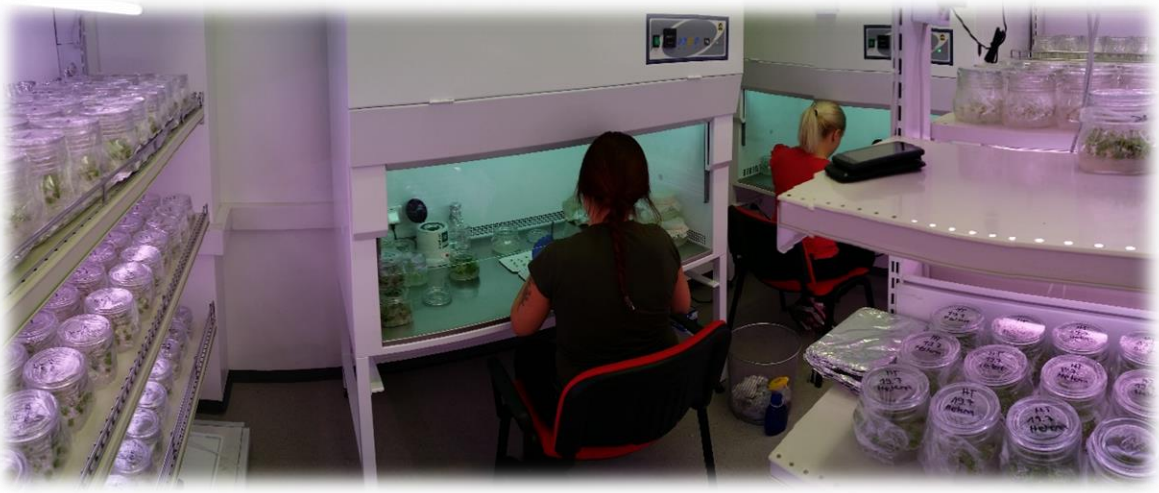
2. MATERIJAL I METODE

2.1. Labaratorij i oprema

Za uspješnu izradu ovog završnog rada bilo je potrebno temeljito prikupiti, istražiti i proučiti dostupnu literaturu i podatke vezane za mikropropagaciju višnje i Oblačinsku višnju. Osim dostupnih knjiga, 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).

Ovo istraživanje je obavljen u *in vitro* laboratoriju za voćarstvo (FAZOS) tijekom 2020. godine. U sklopu labaratorija izvode se mnoga *in vitro* istraživanja na raznim voćnim vrstama (višnja, malina, orah, borovnica, paulovnija, lijeska, vegetativne podloge za trešnju, agrume, goji, itd.). Katedra se bavi znanstveno istraživačkim radom (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 5.).



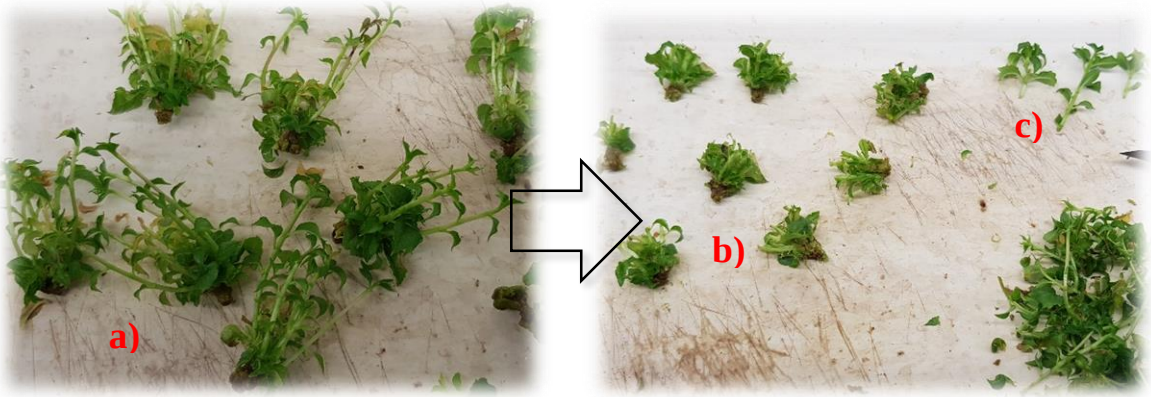
Slika 5. Rad u *in vitro* labaratoriju za voćarstvo, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2018.)

2.2. Opis pokusa i tretmani u istraživanju

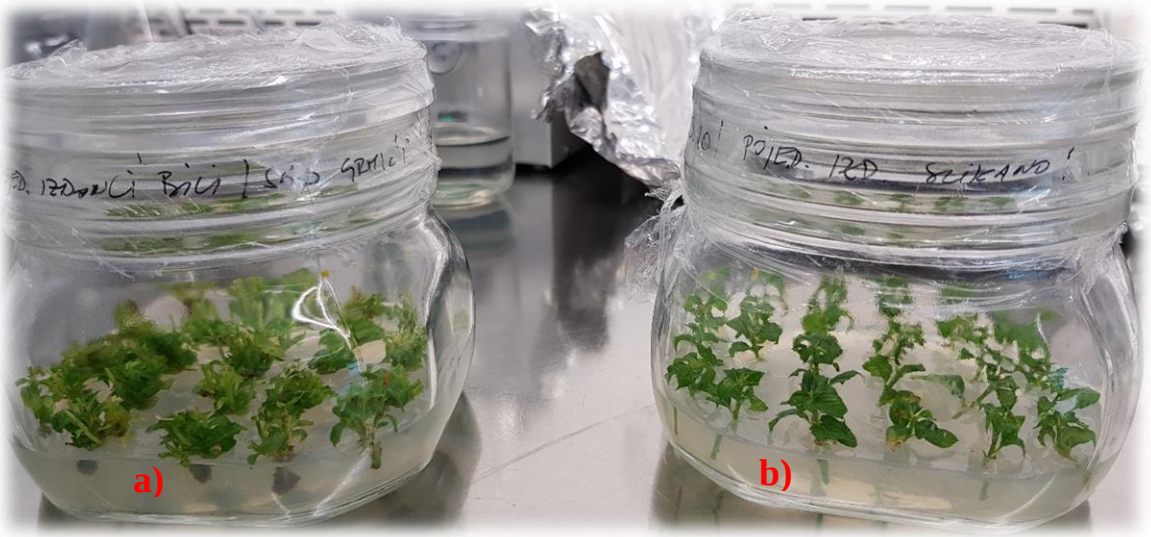
Cilj ovoga završnog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnost mikropropagacije, odnosno organogeneze pojedinih tipova eksplantata Oblačinske višnje *in vitro*. Cijeli pokus je postavljen i proveden u sklopu labaratorija za kulturu tkiva na FAZOS tijekom 2020. godine.

Eksplantati Oblačinske višnje nastali su u labaratoriju prijašnjih godina te se na njima provode razna istraživanja druge tematike (Slika 6.)

Uspoređivana je organogeneza dva tipa eksplantata: pojedinačni izdanci i baze izdanaka Oblačinske višnje (Slika 6. i 7.).



Slika 6. Eksplantati u istraživanju i disekcija: a) početni eksplantati, b) baze izdanaka i c) pojedinačni izdanci, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)



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

Svi eksplantati inicirani su na DKW (Driver i Kuniyuki, 1984.) hranjivu podlogu proizvođača Duchefa Biochemie B.V., Nizozemska (Slika 7.) s dodatkom agara (6.3 g/l), auksina BAP (benzylaminopurine, 0.8 mg/l) i citokinina IBA (Indole-3-butyric acid, 0.01 mg/l) te je pH vrijednost prije autoklaviranju (120 °C, kroz 20 min i tlaku 1.2 bara) podešena na 5.8. Detaljan sastav hranjive podloge korištene u istraživanju nalazi se u tablici 1.

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

MICRO ELEMENTS

	mg/l	µM
$CuSO_4.5H_2O$	0.25	1.00
FeNaEDTA	44.63	121.61
H_3BO_3	4.80	77.63
$MnSO_4.H_2O$	33.80	200.00
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.39	1.61
$ZnSO_4.7H_2O$	17.00	72.19

MACRO ELEMENTS

	mg/l	mM
$CaCl_2$	112.50	1.01
$Ca(NO_3)_2.2H_2O$	1664.64	8.30
KH_2PO_4	265.00	1.95
K_2SO_4	1559.00	8.95
$MgSO_4$	361.49	3.00
NH_4NO_3	1416.00	17.70

Total concentration Micro and Macro elements: 5479.50 mg/l

VITAMINS

	mg/l	µM
Glycine	2.00	26.64
myo-Inositol	100.00	554.94
Nicotinic acid	1.00	8.12
Thiamine HCl	2.00	5.93

Svi tretmani uključivali su po 25 eksplantata u dvije repeticije (ukupno: 4 teglice x 25 eksplantata = 100 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 8.).

Slika 8. Uvjeti klima komore u pokusu, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

2.3. Mjerenja u istraživanju

Nakon 30 dana pristupilo se mjerenju morfoloških parametara i evaluaciji pojedinih tretmana u istraživanju (Slika 9.).

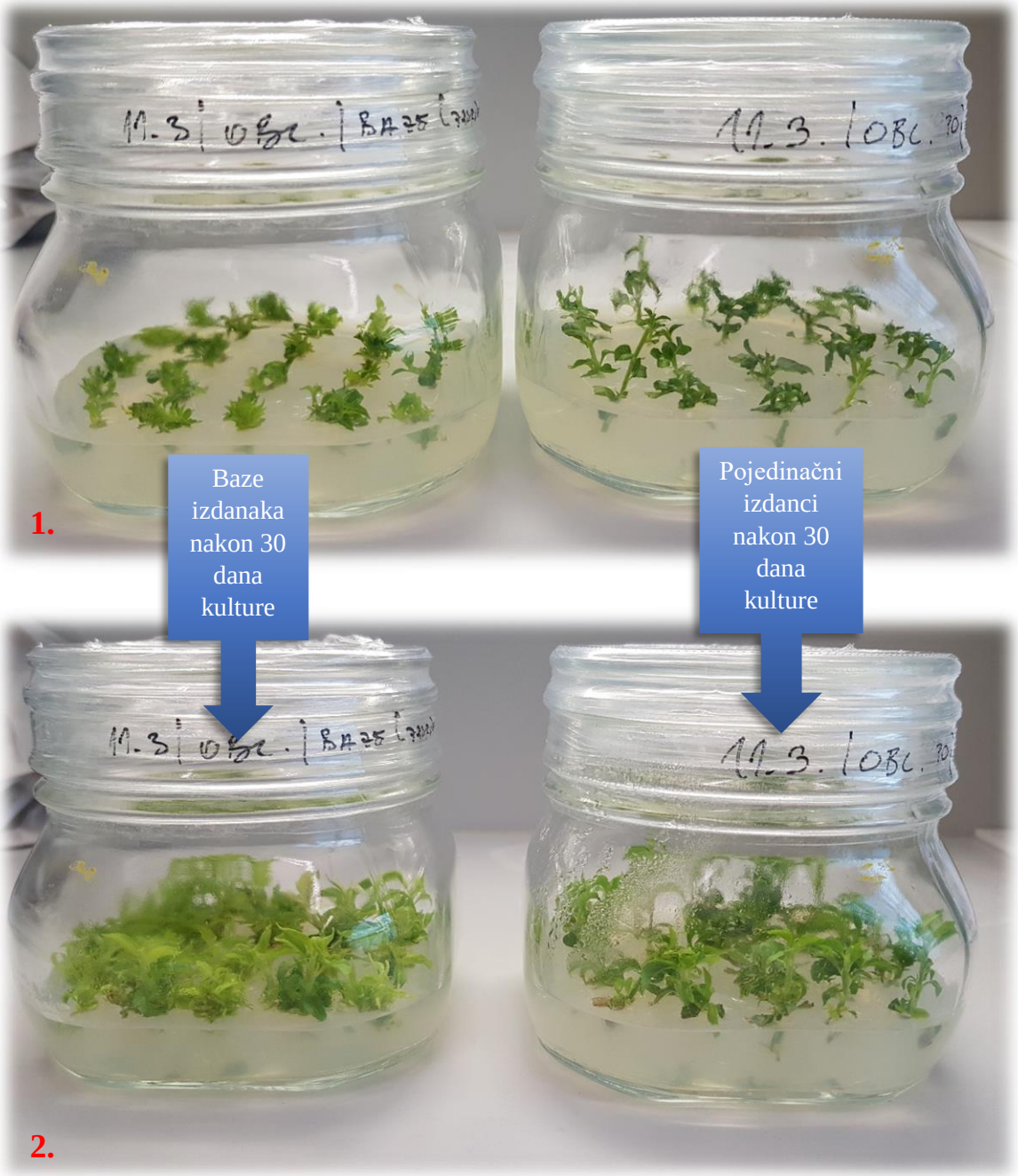
Mjereni su morfološki parametri:

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

Slika 9. Mjerenje morfoloških parametara, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

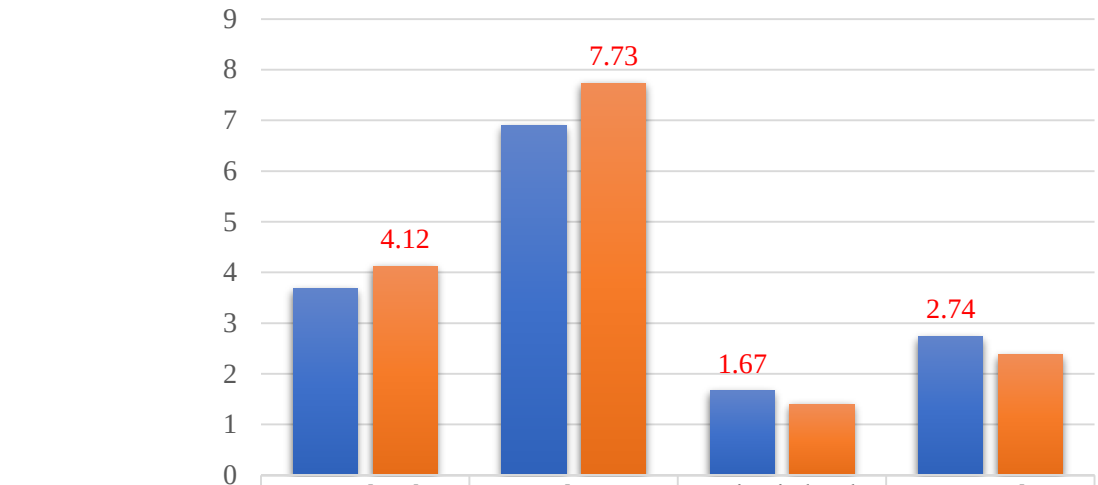
3. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon 30 dana kulture svi tretmani uspješno su i bez kontaminacije uspjeli inicirati dovoljnu biomasu za provođenje morfoloških mjerenja (Slika 10.). Nije uočen stresni utjecaj podloge ili uvjeta klima komore kroz period organogeneze eksplantata *in vitro*.



Slika 10. Inicijacija biomase nakon 30 dana kulture: 1. (tretmani neposredno po uvođenju u kulturu), 2. (tretmani nakon 30 dana kulture), FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

Prema dobivenim rezultatima (Grafikon 2.) tretman koji je uključivao baze izdanaka (Slika 11.) inicirao je veći broj izdanaka (4.12) i veći broj listova (7.73) u odnosu na tretman s pojedinačnim izdancima. Dužina izdanaka (1.67.) i broj nodija bio je veći na tretmanu s pojedinačnim eksplantatima (Grafikon 2.).



	Broj izdanaka	Broj listova	Dužina izdanaka	Broj nodija
Pojedinačni izdanci	3.68	6.89	1.67	2.74
Baza izdanaka	4.12	7.73	1.40	2.38

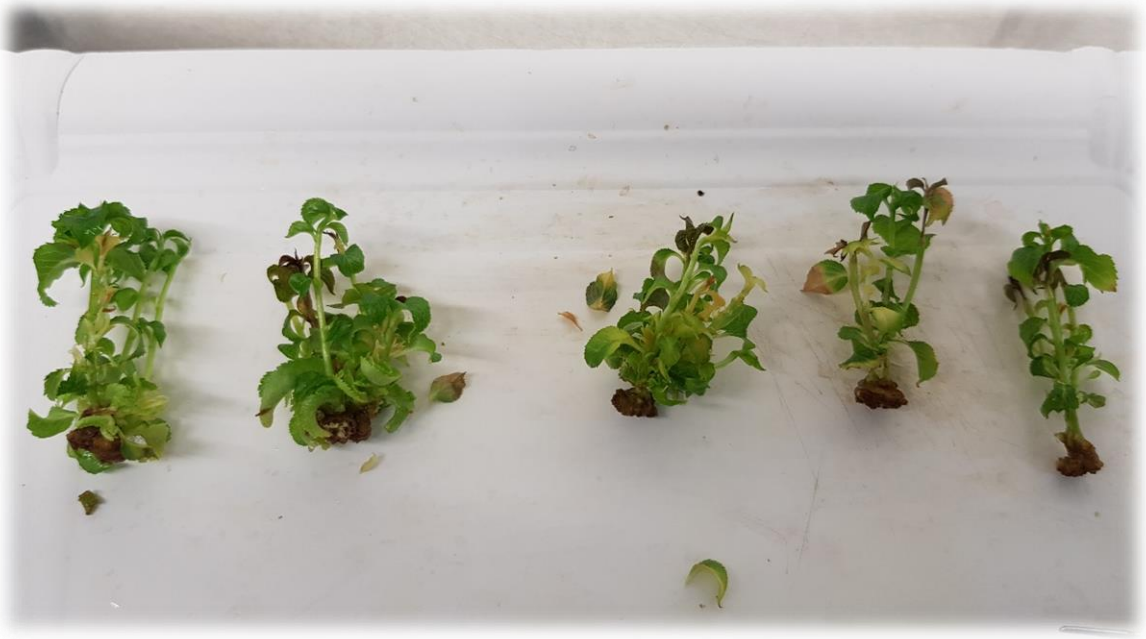
Grafikon 2. Rezultati organogeneze eksplantata Oblačinske višnje

Slika 11. Organogeneza baza izdanaka, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

Rezultati ukazuju na mogućnost organogeneze oba tipa eksplantata. Praksa većine labaratorija za *in vitro* uključuje baze izdanaka u daljnju multiplikaciju (umnožavanje) dok se pojedinačni izdanci koji su dostigli odgovarajuću visinu i debljinu prijenose u daljnju fazu mikropropagacije, odnosno inicijaciju korijena (faza rizogeneze – ukorjenjivanje, slika 12.) ili odbacuju (uništavaju) u daljnjoj fazi multiplikacije. Rizogeneza pojedinačnih izdanaka zahtjeva: prebacivanje eksplantata na medij sa smanjenom koncentracijom makroelemenata (soli), povećanje koncentracije auksina i potpuno izbacivanje citokinina (Slika 12.).

Slika 12. Rizogeneza eksplantata Oblačinske višnje: a. rizogeneza i b. ukorijenjeni pojedinačni izdanak za aklimatizaciju, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

Ovim istraživanjem dokazana je mogućnost organogeneze mikro izdanaka iz aksilarnih pupoljaka s eksplantata pojedinačnog izdanka (Slika 13.). Prema grafikonu 2., na iniciranom pojedinačnom izdanku (eksplantatu) u prosjeku je nastalo 3.68 novih pojedinačnih izdanaka koji su bili duži (1.67) i s većim brojem nodija (2.75) u odnosu na izdanke nastali iz baza izdanaka.



Slika 13. Organogeneza pojedinačnih izdanaka, FAZOS (Izvor: Bošnjak, 2020.)

Tijekom mjerenja morfoloških parametara i učinkovitosti pojedinih tretmana primijećena je blaga, odnosno minimalna vitrifikacija (hiperhidriranost) listova pri bazi eksplantata. Ova štetna pojava utječe na nižu stopu preživljavanja u daljnjim fazama mikropropagacije, posebice aklimatizaciji ukoliko je izražena većim intenzitetom.

Ukoliko nam je potrebna brza i masovna produkcija sadnog materijala Oblačinske višnje, uključivanje pojedinačnih izdanaka u daljnju fazu multiplikaciju (umnožavanje) nameće se kao idealno rješenje. U konačnici, DKW podloga s korištenim koncentracijama biljnih hormona koja uključuje i baze i izdanke kao vrste eksplantata preporuča se u mikropropagaciji Oblačinske višnje.

Buduća istraživanja usmjeriti ispitivanju utjecaja različitih vrsta i koncentracija biljnih regulatora rasta (citokinina i auksina) na pojedine tipove eksplantata, prvenstveno na pojedinačne izdanke.

4. ZAKLJUČAK

Kultura tkiva *in vitro* omogućuje dobivanje visokokvalitetnog i zdravstveno ispravnog sadnog materijala u vrlo kratkom periodu, a proizvodnja se odvija u aseptičnim i kontroliranim uvjetima. Interes novih potencijalnih proizvođača višnje usmjeren je odabiru poznatih i tradicionalnih kultivara našeg uzgojnog područja. Oblačinska višnja predstavlja vodeću sortu višanja u prerađivačkoj industriji Hrvatske zbog svojih pomoloških karakteristika, pogodnosti za strojnu berbu te rane zrelosti i dobre plodnosti.

Istraživanje o mogućnosti mikropropagacije, odnosno organogeneze pojedinih tipova eksplantata Oblačinske višnje provedeno je na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (*in vitro* labaratorij za voćarstvo) tijekom 2020. godine.

Na osnovu dobivenih rezultata zaključujemo sljedeće:

- Nakon 30 dana kulture svi tretmani bez kontaminacije i stresnog utjecaja podloge ili uvjeta klima komore uspjeli su inicirati dovoljnu biomasu za provođenje morfoloških mjerenja.
- Rezultati ukazuju na mogućnost organogeneze oba tipa eksplantata.
- Tretman koji je uključivao baze izdanaka inicirao je veći broj izdanaka i listova u odnosu na tretman s pojedinačnim izdancima.
- Dokazana je mogućnost organogeneze mikro izdanaka iz aksilarnih pupoljaka s eksplantata pojedinačnog izdanka.
- Na iniciranom pojedinačnom izdanku (eksplantatu) u prosjeku je nastalo 3.68 novih pojedinačnih izdanaka koji su bili duži i s većim brojem nodija u odnosu na izdanke nastali iz baza izdanaka.
- Uključivanje pojedinačnih izdanaka u daljnju fazu multiplikacije (umnožavanja) nameće se kao idealno rješenje ukoliko nam je potrebna masovna i brza produkcija sadnog materijala.
- DKW podloga s korištenim koncentracijama biljnih hormona koja uključuje oba tipa eksplantata preporuča se u mikropropagaciji Oblačinske višnje.
- Buduća istraživanja usmjeriti ispitivanju utjecaja različitih vrsta i koncentracija biljnih regulatora rasta (citokinina i auksina) u multiplikaciji pojedinih tipova eksplantata, a prvenstveno pojedinačnih izdanaka.

5. POPIS LITERATURE

1. Bošnjaković, D., Ognjanov, V., Ljubojević, M., Barać, G., Predojević, M., Mladenović, E., Čukanović, J. (2012.): Biodiversity of wild fruit species of Serbia, Genetika–Serbia, 44: 81–90.
2. Brown, S.K., Iezzoni, A.F., Fogle, H.W. (1996.): Cherries, In: Fruit breeding, Volume I: Tree and tropical fruits (Janick, J., Moore, J.N., eds.). John Wiley and Sons, Inc., pp.213-255.
3. Buckley, P.M., Reed, B.M. (1994.): Antibiotic susceptibility of plant associated bacteria. Hort. Sci. 29:434.
4. Cerović, R., Ružić, Đ. (1987.): Micropropagation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cv. Šumadinka, Plant Cell Tiss Org, 9:151–157.
5. Constantine, D.R. (1986.): Micropropagation in the commercial environment, In: Withers, L.,Alderson, P.G. (Eds.), Plant tissue culture and its agricultural applications, Butterworth, London, pp.175-186.
6. Cuenca, B., Vietiez, A.M. (2000.): Influence of carbon source on shoot multiplication and adventitious bud regeneration in in vitro beech cultures, Plant Growth Regulation, 32:1–12.
7. Custodio, L, Loucao, M.A., Romano, A. (2004.): Influence of sugars on In vitro rooting and acclimatization of carob tree, Biologia Plantarum, 48(3):469-472.
8. Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. (1984): In Vitro Propagation of Paradox Walnut Rootstock, Hort. Science, 19(4).
9. Duchefa Catalogue (2010-2012): Plant Cell and Tissue Culture, Phytopatology, Biochemicals, Duchefa Biochemie B.V., Netherlands
10. Druart, P. (2013.): Micropropagation of *Prunus* species relevant to cherry fruit production. In: Lambardi M, Ozudogru EA, Jain SM, editors. Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. New York, NY, USA: Humana Press, pp.119–136.
11. Ďurkovič, J. (2006.): Rapid micropropagation of mature wild cherry, Biologia Plantarum, 50
12. Fotirić, M. (2009.): Klonska selekcija i biologija oplođenja Oblačinske višnje *(Prunus cerasus L.).* Beograd: Poljoprivredni fakultet u Beogradu.

13. George, F. (1993.): Plant propagation by tissue culture, Exergetics Ltd., Edington, England.
14. George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (2008.): Plant propagation by tissue culture 3rd edition, Springer, AA Dordecht, The Netherlands, pp-124.
15. Hammat, N., Grant, N.J. (1997.): Micropropagation of mature British wild cherry, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 47.
16. Hrotko, K. (2008.): Progress in cherry rootstock research, Acta Horticulturae, 795.
17. Hossini, A.D., Moghadam, E.G., Anahid, S. (2010.): Effects of medium cultures and plant grow regulators in micropropagation of Gisela 6 rootstock, Ann Biol Res, 1:135–141.
18. Jašmak, K. (1980.): Medonosno bilje, Nolit, Beograd.
19. Jurković, Z., Dugalić, K., Viljevac, M., Piližota, I., Vokurka, A., Puškar, B., Pejić, A. (2008.): Preliminary report on the use of biotechnology in sweet and sour cherry research, Acta Agron. Hung. 56(4):417-420.
20. Keserović, Z., Magazin, N., Milić, B., Dorić, M. (2016.): Voćarstvo i vinogradarstvo (deo Voćarstvo), Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Novi Sad, 151, 45.
21. Krpina, I. i suradnici (2004.): Voćarstvo, Nakladni zavod globus, Zagreb, 447.
22. Lussier, M.G., Shuff, J.C., Miller, D.J. (1994.): Activated carbon from cherry stones, Carbon, 32, 1493-1498.
23. Mahdavian, M., Bouzari, N., Abdollahi, H. (2011.): Effects of media and plant growth regulators on micropropagation of a dwarfing cherry rootstock (PHL-A), Biharean Biologist, 5:86–90.
24. Mihaljević, I., Dugalić, K., Tomaš, V., Viljevac, M., Pranjić, A., Čmelik, Z., Puškar, B., Jurković, Z. (2013.a): *In vitro* sterilization producers for micropropagation of „Oblačinska“ sour cherry, Journal of Agriculture Sciences, Vol.58, No.2, 117-126.
25. Mihaljević, I., Dugalić, K., Tomaš, V., Viljevac, M., Puškar, B., Čupić, T., Jurković, Z. (2013.b): Utjecaj raznih izvora ugljika na *in vitro* ukorjenjivanje višnje cv. Oblačinska, Pomologia Croatica, Vol.19, br.1-4.
26. Milatović, D., Miletić, N., Nikolić, M. (2011.): Trešnja i višnja, Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak, 500.
27. Miletić, R., Žikić, M., Mitić, N., Nikolić, R. (2008.): Identification and in vitro propagation of promising Oblačinska sour cherry selection in Eastern Serbia, Acta Horticulturae, 759, 159-162.

28. Mišić, D. (1989.): Nove sorte voćaka, Nolit, Beograd.
29. Niedz, R.P., Bausher, M.G., (2002.): Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouseand field-grown trees. In Vitro Cell. Dev. Biol., 38:468-471.
30. Nikolić, D., Rakonjac, V., Milutinović, M., Fotirić, M. (2005.): Genetic divergence of Oblačinska sour cherry (*Prunus cerasus* L.) clones, Genetika, 37(3):191-198.
31. Odutayo, O.I., Oso, R.T., Akynyemi, B.O., Amusa, N.A. (2004.): Microbial contaminants of cultured *Hibiscus cannabinus* and *Telfaria occidentalis* tissues, Afr. J. Biotechnol., 3(9):473-476.
32. Ognjanov, V., Keserović, Z., Mratinić, E., Miletić, R. (2009.): Fruit germplasm in Serbia. In: Proceedings of the Scientific Meeting on the Management of Genetic Resources of Plant and Animal Species in Serbia, Belgrade, Serbia, p.14.
33. Pierik, R.L.M. (1987.): In vitro culture of higher plants, Martinus Nijhoff Dordrecht, pp.24.
34. Preece, J. (2008.): Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis In: George FE, Hall AM, De Klerk GJ, editors. Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd ed. The Netherlands, Springer, p.419.
35. Pruski, K., Astatkie, T., Nowak, J. (2005.): Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fructicosa*) and Nanking cherry (*Prunus tormentosa*), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82.
36. Radičević, S., Cerović, R., Lukić, M., Paunović, S., Jevremović, D., Milenković, S., Mitrović, M. (2012.): Selection of autochthonous sour cherry (*Prunus cerasus* L.) genotypes in Feketić region, Genetika, Serbia, 44:285–297.
37. Rehder, A. (1974.): Manual of cultivated trees and shurbs hardy in North America, Macmillan, New York.
38. Ružić, Đ., Cerović, R. (2003.): Primena in vitro metoda kod koštičavih vrsta voćaka, Jugoslavensko voćarstvo, 37.
39. Sedlak, J., Paprštein, F., Erbenova, M. (2008.): In vitro propagation of PHL dwarfing cherry rootstocks, Acta Hort., 795:395–400.
40. Smith, R.H. (2000.): Plant tissue culture, techniques and experiments, Academic press, San Diego, USA.
41. Viljevac, M., Dugalić, K., Jurković, V., Mihaljević, I., Tomaš, V., Puškar, B., Lepeduš, H., Sudar, R., Jurković, Z. (2012.): Relation between polyphenols content and skin colour in sour cherry fruits, J. Agr. Sci. (Belgrade), 57(2):57-67.

42. Vujović, T., Ružić, Đ., Cerović, R. (2009.): The influence of imidazole fungicide on multiplication in vitro of low-vigorous sweet cherry rootstock Gisela 6, Journal of Pomology, 43:87–93.
43. Vujović, T., Ružić, Đ., Cerović, R. (2012.): In vitro multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks, Hortic Sci., 39:101–107.