

**MIKROPROPAGACIJA DIVLJE TREŠNJE (*Prunus avium* L.)
U KULTURI *IN VITRO*
Micropropagation of wild cherry (*Prunus avium* L.) *in vitro***

D. Marjanović¹, S. Mededović², A. Čaušević³, R. Hadžiselimović¹

1. Institute for Generic Engineering and Biotechnology, University of Sarajevo;

2. Faculty of Forestry, University of Sarajevo;

3. Faculty of Science, University of Sarajevo

Abstract

Apical and axillary buds of mature wild cherry trees (*Prunus avium* L.) were used as the plant explants for establishing the plant tissue culture. They were cultured on a basal MS medium supplemented with growth regulators. Induction of buds were attained on MS medium with 0,5 mg/l BAP and 0,1mg/l IBA added. Almost 80% of buds were successfully opened and regenerated into shoots. Same medium was used for shoot multiplication and their number was tripled after the third multiplication cycle. For rooting selected shoots were put on basal MS medium supplemented with 126 mg/l PG and 3 mg/l IBA. The rooting phase was 20% successful. The best results in regeneration from leaf explants were obtained on DCR medium supplemented with 0,5 mg/l BAP and 0,1 mg/l NAA.

Key words: *Prunus avium*, wild cherry, regeneration, tissue culture, rooting

1. Uvod

Divlja trešnja (*Prunus avium* L.), vrlo plemenita drvenasta vrsta, ima prema Šiliću (1973.) optimum u mezofilnim šumama Europe, Male Azije, Krima, Kavkaza i Irana. To je polimorfna vrsta, sa velikim brojem sojeva u voćarstvu. Iz toga proizilazi i njen izuzetan ekonomski značaj. Nažalost, ovaj genetički resurs je ugrožen nekontrolisanom hibridizacijom sa sortama pitome trešnje. Iz tih razloga, svako ekonomisanje divljom trešnjom zahtjeva organizaciju na najvišem nivou uskladenu sa europskim standardima.

U cilju konzervacije roda *Prunus* formirana je 1993. europska baza podataka -European *Prunus* Database - EPDB (Zanetto, 1996). Već 1996. u ovom projektu uzelo je učešća 95 instituta iz 23 zemlje Europe. Bilo bi važno da se i Bosna i Hercegovina priključi tim zemljama. Svaki dalji projekat u ovom pravcu imao bi kao neobilazni dio i rad na kulturi *in vitro*, što je cilj ovog rada.

Napredak razvoja metodologije kulture *in vitro* počinje 1934. godine, radovima White (1934) i Gautheret (1934). White je odgovorio na mnoga pitanja o hranidbenim potrebama biljaka, dok je Gautheret postavio osnove trajne kalusne kulture. Koristeći, između ostalog, njihova iskustva, Morashige i Skoog (1962.) su uspjeli sintetisati prvi hranjivi medij (MS-medij), na kojem su iz parenhima srčike duhana regenerirali cijelu biljku. Ovaj medij je imao revolucionaran značaj u razvoju metoda kulture *in vitro*.

Potencijalni ekonomski značaj ove metode proizilazi iz činjenice koju ističe Jelaska (1994.), da je multiplikacijom *in vitro*, u toku jedne godine, iz samo jednog eksplantata, moguće dobiti oko 109 biljaka.

2. Materijal i metod

Grančice divlje trešnje sa pupovima (slika 1) prikupljene su 1998. godine, u regionu Pofalića (Sarajevo). Razvrstane su u dvije grupe. Jedna grupa je bila pohranjena u frižider, a druga je održavana u sobnim uvjetima. Tu su ostavljene sedam dana nakon čega se pristupilo izvođenju eksperimenta. Prvo su grančice izrezane na fragmente dužine 10 cm. Fragmenti su površinski sterilisani pranjem u mikrobiološkom sapunu, a zatimu 70% alkoholu, u trajanju od 30 sekundi. Nakon toga sterilizacija je



provedena u rastvoru 100 ml 6% varikine i 400 ml sterilne destilovane vode (30 minuta). U nastavku uzorci su isprani tri puta sterilnom vodom, te osušeni na sterilnom filter papiru. Iz uzoraka su izdvojeni pupovi koji su, u sterilnim uvjetima, pohranjeni na MS medij (Murashige and Skoog medium) uz dodatak 0,5 mg/l BAP (N6-benzilaminopurin) i 0,1mg/l IBA (Indolbutryc acid).

Multiplikacija je provedena na osnovnom MS mediju sa dodatkom 0,5 mg/l BAP i 0,1 mg/l IBA.

Za regeneraciju iz lista korišten je DCR medij (Durzan and Gupta medium) sa dodatkom 0,5 mg/l BAP ili TDZ (Thidiazuron) i 0,1 mg/l NAA (1-Naphtalen-acetic acid). Kemijski sastav MS i DCR podloge prikazan je u tabeli 1.

Orig.

Photo 1: Shoots of wild cherry

Tabela 1- Sastav podloga
Table 1. Contents of media

Contents	Concentration (mg/l)	
	MS	DCR
Macroelements		
NH ₄ NO ₃	1650.0	400.0
KNO ₃	1900.0	340.0
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440.0	85.0
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370.0	370.0
KH ₂ PO ₄	170.0	170.0
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	-	556.0
Iron		
Na ₂ EDTA	37.25	37.3
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27.85	27.8
Microelements		
MnSO ₄ x H ₂ O	22.3	22.3
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
KI	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	0.25
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025	0.025
NICl ₂	-	0.025
Vitamins		
Thyamin - HCl	0.1	1.0
Nicotinic acid	0.5	0.5
Pyrodoxine - HCl	0.5	0.5
Glicin	2.0	2.0
Other		
Myo-inositol	100.0	200.0
Sucrose	30000	30000
Agar	9000	9000
pH	5.7 – 5.8	6.0

Proces zakorjenjivanja izdanaka provoden je na osnovnom MS mediju uz dodatak 126 mg/l PG (Phloroglucinol) i 3 mg/l IBA.

Za indukciju pupanja korištene su epruvete, dok su za multiplikaciju i zakorjenjivanje upotrijebljene tikvice i magende. Za regeneraciju iz lista korištene su petrijevke.

Manipulacija biljnim materijalom odvijala se u aseptičkim uvjetima laminara sa sterilnim instrumentima i podlogama. Sterilizacija podloga odvijala se u autoklavu na 120°C, pri pritisku od 0,1 Mpa, u trajanju od 20 minuta. Instrumenti su sterilisani u suhom sterilizatoru, 3 sata na 180°C. Kulture su uzgajane u komori pri 16 sati svjetla i 8 sati mraka, na temperaturi od 25°C i 70% relativne vlažnosti.

Zakorjenjene biljke su prebacene u saksije sa sterilnom zemljom.

Prebacivanje biljaka u zemlju je obavljeno u aseptičkim uvjetima. Biljke su bile zaštićene staklenom posudom. Tako zaštićene biljke su vraćene u komoru gdje su se postepeno aklimatizirale.

3. Rezultati rada

Uspostavljanje kulture biljnoga tkiva divlje trešnje istraživano je kroz dvije faze:

- a) indukciju aksilarnog i apikalnog pupanja, i
- b) regeneraciju mezofila lista.

Indukcija pupanja se radila u tri serije u razmaku od po 7 dana na MS podlozi, uz dodatak 0,5 mg/l BAP i 0,1 mg/l IBA. Indukcija pupanja materijala koji je bio pohranjen pri sobnoj temperaturi i u frižideru vršena je odvojeno. Primjećeno je da je materijal iz frižidera (4°C) brže reagovao, tako da je nakon sedam dana broj otvorenih pupova na grančicama bio znatno veći nego na onim pri sobnoj temperaturi. Međutim, kako je vrijeme odmicalo i ta razlika se smanjivala. Uspješnost indukcije bila je velika, oko 78% (slika 2).

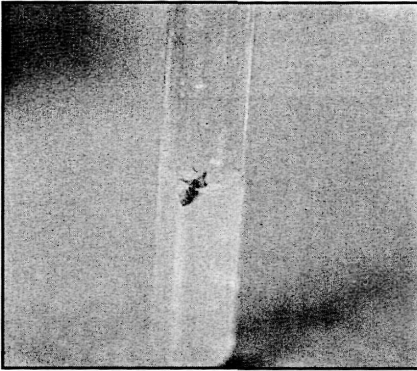


Photo 2: Induction of shoots

Orig.

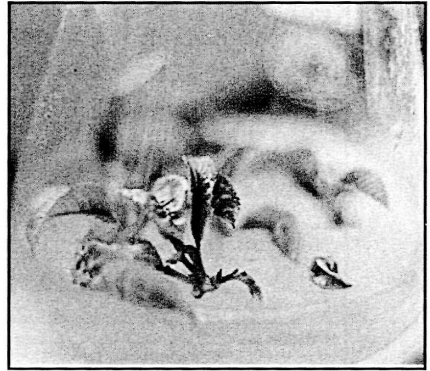


Photo 3: Shoot multiplications

Orig.



Photo 4: Leaves before regeneration

Orig.

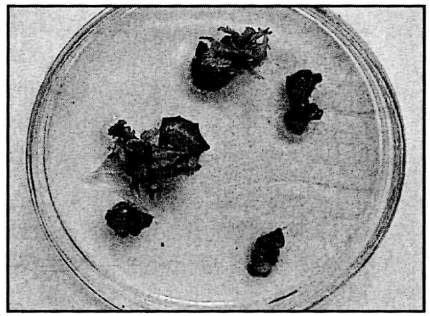


Photo 5: Shoot regeneration from leaves

Orig.

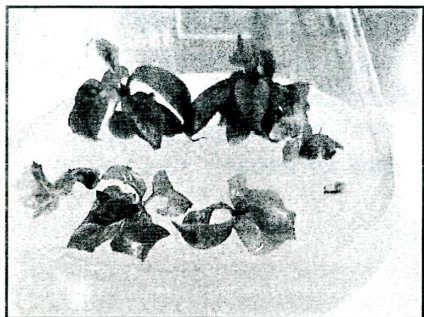


Photo 6: Regenerated shoots
before rooting

Orig.

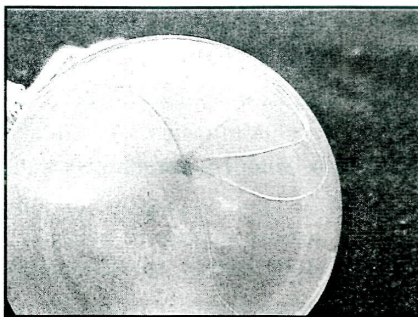


Photo 7: Rooting

Orig.

Nakon 35 dana izdanci su prebačeni na medij za multiplikaciju postavljen u tikvicama. Mjesec dana kasnije, nakon prve multiplikacije broj izdanaka se nije znatnije promjenio. Izostalo je očekivano uvećanje broja izdanaka jer je većina njih bila veoma slabo razvijena pa ih nije bilo moguće separirati. U nekoliko tikvica je došlo do kontaminacije, što je bitno uticalo na efekat multiplikacije. Izgled izdanaka nakon multiplikacije prikazan je na slici 3.

Pošto nije bilo izdanaka koji su imali predispozicije za proces zakorjenjivanja prešlo se na proces regeneracije iz lista. Postavljene su dvije serije sa jednakim brojem listića, dužine od oko 1 cm (slika 4). U jednoj seriji je u sastav MS podloge dodavan BAP, a u drugoj seriji TDZ (u koncentracijama od 0,5 mg/l). U obje serije dodavan je NAA u koncentraciji od 0,1 mg/l. Nakon sedam dana u seriji sa TDZ-om na 16,66% listića pojavio se kalus, a u seriji sa BAP-om bilo ih je 43,30%. Nakon 14 dana taj broj se u seriji sa TDZ-om povećao na 63,3%, a u seriji sa BAP-om na 73,3% (slika 5).

Od izdanaka dobijenih u trećoj multiplikaciji izabran je određen broj koji su stavljeni na medij za zakorjenjivanje (slika 6). Kod 20% izdanaka su se formirali dobro razvijeni korjenovi, dok je kod ostalih formiranje korijena izostalo (slika 7). Izgleda da je presudan faktor rizogeneze bila dužina izdanaka, jer su svi oni duži od 5 cm uspješno oživljeni. Ovo upućuje na činjenicu da bi prije oživljavanja bilo neophodno provoditi postupak elongacije u mraku, što su primjetili Tricoli et al. (1985.) za *Prunus padus*.

Regenerirani izdanci sa korijenom su prebačeni u saksije sa zemljom, nakon čega su se, u roku od 7 dana, pojavili novi listovi na biljci.

3. Diskusija

Eksplantati koji su bili pohranjeni u frižideru pokazali su bolje početne rezultate pri induciranju pupanja. Relativna učestalost induciranih pupova u prvoj sedmici je bila znatno veća, a nastali izdanci su bili jači. Slično su primjetili i Cornu et al. (1981). Oni su početne eksplantate divlje trešnje držali 6 mjeseci pri temperaturi od 4°C i dobili skoro 100% uspješnost indukcije pupanja.

Indukcija pupanja provedena je na osnovnom MS mediju uz dodatak 0,5 mg/l

BAP i 0,1 mg/l NAA. Uspješnost pupanja je bila izuzetno visoka (oko 78%). Isto je primjetio i Chalupa (1984.). On se za stimulaciju razvoja aksilarnih pupova u kulturi *in vitro* *Quercus robur* L., *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. koristio medijima u kojima se koncentracija BAP-a kretala od 0,2-0,8 mg/l. Koristeći se istom podlogom, dobio je odlične rezultate i u procesu multiplikacije izdanaka. To se desilo i u našem slučaju, gdje se početni broj pupova, nakon treće multiplikacije, uvećao skoro 3 puta. Indukcija pupanja se pokazala kao dobar način za uspostavljanje kulture *in vitro* i za divlju trešnju. Do istog zaključka su došli i Meier-Dinkel (1986.) i Riffaud (1980.) u svojim radovima.

U našim istraživanjima zakorjenjivanje je sprovedeno na MS podlozi, uz dodatak 3 mg/l IBA i 126 mg/l PG. U roku od 14 dana došlo je do formiranja dobro razvijenog korjena na određenom broju eksplantata. Slične rezultate dobili su i Vietez et al. (1980.) pri indukciji korjena kod *Castanea sativa* L., koristeći MS medij uz dodatak IBA u koncentraciji od 3 do 5 mg/l, kao i Kamenicka i Rypak (1984.) na divljem kestenu (*Aesculus hippocastanum* L.).

Proces regeneracije iz lista sproveden je u dvije paralelne serije. U prvoj seriji primjenjen je osnovni DCR medij, uz dodatak 0,1 mg/l NAA i 0,5 mg/l BAP. U drugoj seriji umjesto BAP-a, dodan je TDZ u istoj koncentraciji. Serija sa BAP-om pokazala je bolje rezultate. Do inicijalnog formiranja izdanaka došlo je na oko 73% eksplantata. Slične rezultate pri regeneraciji iz lista kod divlje trešnje dobili su Rogatis i Fabbri (1998.) primjenjujući DCR medij uz dodatak 4mg/l BAP i 4mg/l NAA. U njihovom eksperimentu je došlo do formiranja izdanaka na 80% eksplantata. Zanimljivo je da su rezultati do kojih su došli Hammat i Grant (1997.) pokazali da se u procesu regeneracije iz lista kod divlje trešnje, na WPM mediju dobiju povoljniji rezultati u seriji sa TDZ-om nego u seriji sa istom koncentracijom BA.

Induciranje pupanja aksilarnih i adventnih pupova divlje trešnje pokazalo se veoma uspješnim. Moguće poboljšanje uspješnosti ovoga procesa zahtijeva promjenu u tretmanu početnih eksplantata, kako u smislu konkretnih uvjeta u kojima se oni pothranjuju, tako i u smislu potencijalne manipulacije koncentracijama korištenih citokinina. Dobri rezultati u procesu multiplikacije mogu biti poboljšani određenim izmjenama u sastavu medija. Tu se prvenstveno misli na izmjene regulatora rasta, kako u kvalitativnom, tako u kvantitativnom smislu. Zakorjenjivanje se pokazalo kao jedna od najkritičnijih faza uspostavljanja kulture *in vitro* divlje trešnje. Ovaj proces se može unaprijediti indirektno i direktno. Prvi način zahtijeva spomenute manipulacije medijom za multiplikaciju, koje bi uslovile dobijanje većeg broja dovoljno razvijenih izdanaka za proces zakorjenjivanja. Drugi način podrazumjeva balansiranje koncentracija auksina u mediju za zakorjenjivanje, sve do dobijanja podloge koja bi ispunjavala sve hranidbene potrebe izdanaka, u procesu formiranja dobro razvijenog korjena. Također bi bio opravdan i pokušaj zakorjenjivanja u uvjetima kontinuiranog mraka, jer su Tricoli et al. (15) u takvim uvjetima dobili najbolje rezultate pri formiranju korjena *Prunus padus* L. Izgleda da je jedan od ograničavajućih faktora oživljavanja izdanaka mogao biti i njihova dužina, jer su duži izdanci imali veći uspjeh zakorjenjivanja.

4. Zaključak

Uspostavljanje kulture *in vitro* divlje trešnje se odvijalo u sljedećim sekvencama:

- a) Indukcija adventivnog i aksilarnog pupanja i diferencijacija pupa u izdanke,
- b) multiplikacija izdanaka, i
- c) zakorjenjivanje izdanaka

U kulturi *in vitro* divlje trešnje proces indukovanja pupanja, koji je proveden na osnovnom MS mediju uz dodatak 0,5 mg/l BAP i 0,1 mg/l IBA, imao je izuzetno dobre rezultati: pupanje je inducirano u 78% eksplantata, a proces multiplikacije (nakon treće serije) bio je skoro utrostručen. Proces zakorjenjivanja na osnovnom MS mediju uz dodatak 3mg/l IBA i 126 mg/l PG, bio je oko 20%.

Što se tiče regeneracije iz lista, koja je izvedena na osnovnom DCR mediju sa dodatkom 0,5 mg/l BAP i 0,1 mg/l NAA (prva serija), odnosno 0,5 mg/l TDZ i 0,1 mg/l NAA (druga serija), inicijalni rezultati su bili bolji u prvoj seriji sa BAP-om. Iz dobijenih rezultata proizilazi činjenica da je pri mikropropagaciji divlje trešnje još nedovoljno riješena faza zakorjenjivanja. Naš budući rad biće usredsređen na razradu ovog postupka.

Literatura:

1. Chalupa V. (1984): Vegetativno umnožavanje hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.), lipe (*Tilia cordata* L.) i (*Sorbus aucuparia* L.) u *in vitro* uvjetima. Lescnictvie, 30: 1019-1028.
2. Cornu D., Riffaud J.L., Capelli P. (1981): *In vitro* propagation of wild cherry tree (*Prunus avium* L.). Colloque IUFRO-Afocel, (Fontainebleau): 133-134.
3. Gautheret R.J. (1934): Culture du tissu cambial. C.r.Acad.Sci. 198: 2195-2196.
4. Gupta P.K., Durzan D.J. (1985): Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugar Pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports 4:177- 179.
5. Hammat N., Grant N.J. (1997): Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *Prunus avium* L. (wild cherry). Plant Cell Report 17: 526-530.
6. Jelaska, S. (1994): Kultura biljnih stanica i tkiva. Školska knjiga, Zagreb.
7. Kamenicka A., Rypak M. (1984): Možnosti indukcije organogenezy pagaštana kon sekeho (*Aesculus hippocastanum* L.) *in vitro*. Biologia, 39: 531-536.
8. Mededović S. (1998): Regeneracija u kulturi zrelog embrija panciceve omorike-*Picea omorika* (Panic) Purkinje. Radovi šumarskog fakulteta 1: 27-35.
9. Meier-Dinkel A. (1986): *In vitro* propagation of selected genotypes of mazzard (*Prunus avium* L.). Allgemeine-Forst-und-Jagdzeitung. 157: (7): 139-144.
10. Murashige T., Scoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Psysiol Plant 15: 473-499.
11. Ochatt S.J. (1991): Strategies for plant regeneration from mesophyll Protoplasts

- of the recalcitrant and farmwoodland species *Prunus avium* L. (sweet / wild cherry), *Rosaceae*. J.Plant.Physiol. 139: 155-160.
12. Riffaud, J.L., (1980): Vegetative propagation of wild cherry (*Prunus avium* L.). Document-Centre-de-Recherches-Forestieres-d'Orleans: 80/1.
 13. Rogatis A.D., Fabbri F. (1998): Improved regeneration of wild cherry (*Prunus avium* L.). In press.
 14. Šilić, Č (1973): Atlas drveća i grmlja. Svjetlost, Sarajevo.
 15. Tricoli D.M., Maynard C. A., Drew A.P. (1985): Tissue culture of propagation of mature trees of *Prunus serotina* Ehrh. I. Establishment, multiplication, and rooting *in vitro*. Forest-Science 31: (1): 201-208.
 16. Vietez A. M., Vietez M. L. (1980): Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. J. Hort. Sci., 55: 83-84.
 17. White Ph.R. (1934): Potentially unlimited growth of excised root tips in a liquid medium. Plant Physiol. 9: 585-600.
 18. Zanetto A. (1996): The European *Prunus* Database (EPDB)-Status of database. Report of Working Group on *Prunus* 1: 4-8.

Summary

Prunus avium is very important part of interspecific diversity of European forests and is high-valued wood. This genetic resource is endangered due to uncontrolled felling and noncontrolled hybridization with sweet cherry. An attempt was made to develop method culture *in vitro* thus to contribute conservation of this genetic resource.

Induction of apical and axillary buds of mature wild cherry tree carried out on the MS medium, with 0,5 mg/l BAP and 0,1mg/l IBA growth regulators added, was very successful and almost in 80% of buds were opened and regenerated into shoots.

Multiplication of shoots on the same medium was almost tripled after third cycle.

A number of leaves from these plants were regenerated on DCR medium containing 0,5 mg/l BAP and 0,1 mg/l NAA or 0,5 mg/l TDZ and 0,1 mg/l NAA. Better results were achieved in series with BAP (regeneration was successful in 73%).

Rooting on basal MS medium, supplemented with 126 mg/l PG and 3 mg/l IBA, was successful only 20%. Apparently further research is needed to increase knowledge of rooting process.