

## RAZMNOŽAVANJE TREŠNJE (*PRUNUS AVIUM L.*) TEHNIKAMA KULTURE "IN-VITRO"

T. JEMRIĆ

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Zavod za voćarstvo

Faculty of Agriculture University of Zagreb  
Department of Pomology

### SAŽETAK

U ovom radu dan je pregled problema vezanih uz razmnožavanje trešanja metodama "in-vitro". Ova tehnologija u novije vrijeme postaje sve interesantnija zbog povećanja potreba za zdravim sadnim materijalom uzrokovane intenziviranjem proizvodnje trešanja. "In-vitro" tehnologija je posebice interesantna u oplemenjivanju ranih sorata i stvaranju novih podloga, kao i za čuvanje materijala u bankama biljnih gena. Glavni problemi su vezani uz odabir eksplantata, uvjete tijekom postupka i sastav hranjivog medija.

Ključne riječi: trešnja, in-vitro, problemi, oplemenjivanje, banka gena

### UVOD

Trešnja je dugo vremena bila relativno zapostavljena voćna vrsta. Glavni ograničavajući čimbenik za njezin intenzivniji uzgoj je bio nepostojanje odgovarajuće slabo bujne podloge na kojoj bi se i ova vrsta mogla uzgajati u gustom sklopu. Zahvaljujući naporima oplemenjivača, prvenstveno u Njemačkoj, dobiveno je nekoliko vrlo dobrih slabo bujnih podloga za trešnju. Osim toga, u Kanadi na istraživačkoj stanici Summerland stvoreno je i nekoliko vrlo kvalitetnih samooplodnih sorata s prosječnom masom ploda većom od 10 grama.

Nakon ovoga počelo se s podizanjem intenzivnih trešnjika diljem Europe i svijeta. Suvremena tehnologija uzgoja trešnje predviđa sklop od 700-1000 biljaka po jednom hektaru tako da je naglo narasla potreba za kvalitetnim sadnim materijalom oslobođenim od virusa koji je jedino moguće proizvesti postupcima "in-vitro".

Pored toga, i dalje traje selekcijski rad na dobivanju novih sorata. Posebice su zanimljive rane sorte po mogućnosti manje bujnosti i samooplodne. Međutim, zbog vrlo kratke druge faze rasta ploda u kojoj se formira sjemenka i

endokarp, kod ranih sorata postoji veliki udio nekljavog sjemena. Ta je činjenica bila glavna prepreka u selekciji ranih sorata, ne samo trešnje (Janečková i sur., 1994.) nego i drugih koštičavih vrsta voćaka. Postupcima "in-vitro", kao što je kultura embrija, moguće je svladati i ovu prepreku tako da slobodno možemo reći da je postupak "spašavanja embrija" redovna metoda koja se koristi u selekciji ranih sorata koštičavih vrsta voćaka.

Osim toga, sužavanje genetske raznolikosti unutar pojedine biljne vrste kao posljedica sužavanja sortimenta nameće potrebu za očuvanjem genetske raznolikosti u tzv. bankama biljnih gena. Upravo su postupci kulture biljnog tkiva "in-vitro" vrlo pogodni za ovu svrhu jer zahtijevaju malo prostora.

Iz navedenog je vidljivo da postupci razmnožavanja drvenastih kultura "in-vitro" pobuđuju pozornost ne samo znanstvenika nego i komercijalnih proizvođača sadnog materijala.

U ovom radu bit će dat pregled nekih rezultata istraživanja na području razmnožavanja trešnje postupcima "in-vitro".

#### *Prednosti i mane razmnožavanja "in-vitro"*

Metode razmnožavanja "in-vitro" u odnosu na ostale postupke razmnožavanja imaju brojne prednosti, a među najvažnije bismo mogli ubrojiti sljedeće (Webster, 1996.):

- a. mogućnost brze multiplikacije materijala koji se nalazi u vrlo ograničenoj količini
- b. mogućnost multiplikacije klonova koje je teško razmnožavati drugim postupcima
- c. postupak razmnožavanja se može odvijati cijele godine, neovisno o vremenskim prilikama
- d. materijal se uzgaja bez prisustva bolesti i štetnika, što nije moguće kod primjene uobičajenih metoda.
- e. ovim je postupkom često moguće inducirati epigenetske promjene u materijalu koje mogu poboljšati njegovo razmnožavanje uobičajenim postupcima

Treba također reći i to da pored prednosti razmnožavanje postupcima "in-vitro" ima i određene nedostatke koji ograničavaju njegovu širu primjenu. Najvažniji nedostaci su (Webster, 1996.):

- a. skupa početna ulaganja u opremu
- b. za aklimatizaciju biljaka na normalne uvjete potrebna je sofisticirana i skupa oprema
- c. biljke koje su razmnožavane postupcima "in-vitro" mogu stvarati povećan broj izdanaka, ili zatezati ulazak u rod
- d. regeneracija biljaka iz adventivnih pupova vrlo često može dovesti do nepoželjnih somatskih mutacija

Svi navedeni nedostaci ipak nisu takvi da bi u potpunosti ograničavali primjenu postupaka razmnožavanja "in-vitro" i uglavnom se mogu riješiti. Bitno skraćivanje trajanja razmnožavanja i količina zdravih biljaka koju je moguće proizvesti od relativno malog početnog materijala daju postupcima "in-vitro"

nesumnjivu prednost u razmnožavanju drvenastih kultura, i to ne samo voćaka, nego i šumskih vrsta i ukrasnog bilja.

#### *Pregled problema i primjena razmnožavanja trešnje u uvjetima "in-vitro"*

Unutar ovog područja ima još dosta neriješenih problema. Jedan od njih je svakako i izvor ugljikohidrata u hranjivom mediju. Druart (1990.b) je istraživao utjecaj koncentracije i vrste ugljikohidrata u hranjivom mediju na pojavu sekundarne embriogeneze u kulturi embrioida kod podloge Inmil/GM9. Ovi čimbenici su imali značajan utjecaj na rast embriogenih kalusa i razvoj izoliranih somatskih embrija. Od šest istraživanih vrsta ugljikohidrata, maltoza se pokazala najboljim izvorom energije u hranjivom mediju.

Također je i aktualan problem djelovanja regulatora rasta u hranjivom mediju na razvoj embrija. Poznato je da dodavanje ekstrakta iz endosperma, nucelusa, integumenata i perikarpa plodova u koncentraciji 0,001-1% ima inhibirajući učinak na njihov razvoj (Zdruikovskaya-Rikhter, 1989.). To se objašnjava djelovanjem auksina i citokinina u ekstraktu koji uvjetuju nenormalan razvoj nekih dijelova embrija, kao što je npr. stvaranje kompaktnog kalusa na kotiledonima. Ova pretpostavka je i potvrđena činjenicom da je slična pojava uočena kada je hranjivom mediju dodan kinetin u koncentraciji 0,5 mg l<sup>-1</sup>. Ipak, bilo bi potrebno detaljnije istražiti ovu pojavu jer je kod manjeg broja embrija zapažena organogeneza unutar kalusa.

U kulturi nezrelih zigotskih embrija poticanje somatske embriogeneze u tkivu kotiledona ovisi o veličini embrija. (De March i sur., 1993.). Embriji veličine 2,5-3,5 mm imaju veći potencijal za somatsku embriogenezu od onih veličine 3,6-4,5 mm. Ako se dio 2,4 D u hranjivoj podlozi zamijeni s NAA, učestalost indukcije somatske embriogeneze se smanji. Ipak, i u najpovoljnijim uvjetima broj kotiledona koji ulaze direktno u somatsku embriogenezu ne prelazi 2,5%. Zbog toga su možda interesantnija istraživanja adventivne organogeneze koja daju veći broj regeneriranih biljaka. Tako su Schmidt i Kardel-Meisner (1992.) istraživali mogućnost regeneracije adventivnih izboja iz kotiledona (cijeli ili izrezani na dva do tri segmenta) embrija sorata: Alma, Bianca, Büttners Rote Knorpel, Regina i Van koji su bili izolirani jedan do četiri tjedna prije pune zrelosti. Nakon pet tjedana kultiviranja na podlozi MS s različitim koncentracijama BA i IAA, oko 40% segmenata proksimalne trećine kotiledona ušlo je u regeneraciju. Sorte su se razlikovale ne samo po optimalnoj koncentraciji BA i IAA potrebnoj za regeneraciju nego i po udjelu kotiledona na kojima je došlo do regeneracije adventivnih izboja. Taj udio je kod sorte Alma bio najviši (87%) a kod sorte Büttners Rote Knorpel najmanji (64%). Treba također naglasiti i to da sorta Alma nije bila osjetljiva na koncentraciju BA i IAA, što nije bio slučaj s ostalim sortama. Optimalna koncentracija je 1-2 mg l<sup>-1</sup> za BA i 1 mg l<sup>-1</sup> za IAA. Prosječan broj izboja u optimalnim uvjetima bio je također ovisan o sorti i iznosio je 2,5-2,9 izboja po proksimalnoj trećini kotiledona.

Pojava da samo proksimalna regija kotiledona ima sposobnost regeneracije izboja zabilježena je i kod drugih voćnih vrsta kao što su višnja i šljiva (Mante i sur., 1989.).

Poznata je također i primjena ove tehnike u oplemenjivačkom radu za povećanje proizvodnje embrija nakon križanja (Schmidt i Ketzl, 1993.). U tu svrhu koristi se sjeme iz plodova koji su prerano otpali. Kod nekih sorata, kao što su Regina i Sam, više od 90% embrija biva sposobno za regeneraciju nakon 50-60 dana. Nakon kultiviranja na MS podlozi, kotiledoni se tretiraju s 2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA i 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IAA, a to izaziva pojavu adventivnih izboja nakon 10-14 dana. Dijeljenje kotiledona nije poboljšalo regeneraciju. Vrlo interesantno je i to da je uočena pojava patuljastog rasta na 45% sjemenki iz prerano otpalih plodova, dok je ta pojava bila prisutna na svega 13% sjemenki iz potpuno razvijenih plodova. Osim toga, patuljasti rast bio je nasljedan kod sorti Valeska, Stela i Sunburst. Kod biljaka regeneriranih u uvjetima "in-vitro" nisu uočene nikakve deformacije listova bez obzira je li sjeme jarovizirano ili ne. Nasuprot tome, na 2/3 biljaka koje nisu jarovizirane pojavile su se deformacije lisne baze.

Postupci razmnožavanja "in-vitro" primjenjuju se u oplemenjivačkom radu ne samo kroz tehniku "spašavanja embrija" kod ranih sorata, nego i u oplemenjivanju pomoću mutacija izazvanih radioaktivnim zračenjem. Ovim postupcima moguće je uzgojiti veći broj biljaka od ozračenog materijala, a isto tako i obaviti dehimerizaciju, tj. eliminaciju nemutiranog tkiva iz himeričkoga tkiva tako da se dobije čista linija ozračenih mutanata (Friedrich i sur., 1995.). Pored navedenog, mutacije se mogu izazvati i direktno na eksplantatima kultiviranim "in-vitro" (apikalni i aksilarni pupovi) primjenom radioaktivnog zračenja  $\gamma$ -zrakama u dozi od 30 Gy ili primjenom kolhicina u koncentraciji 0,1% (Theiler-Hedtrich, 1990.).

Nisu kotiledoni jedini dijelovi koji se koriste za razmnožavanje trešnje postupcima "in-vitro". Postoje istraživanja regeneracije iz kalusa dobivenog kulturom prašnica (Long i sur., 1994.). Ne samo da su takva istraživanja prilog razvoju biotehnoloških postupaka za razmnožavanje trešnje nego su i korisna u mapiranju gena u populaciji određene biljne vrste. Međutim, primjena ove tehnike nije podjednako učinkovita za sve voćne vrste. Tako je učestalost indukcije kalusa u jabuke 2-48%, ovisno o sorti, dok u trešnje taj udio iznosi svega 0,1-7% (Hofer i Hanke, 1990.). Potrebno je, dakle, raditi na usavršavanju ove tehnike kako bi se mogla upotrebljavati u oplemenjivačkom radu.

Još jedna interesantna primjena tih metoda je i u oplemenjivanju podloga na toleranciju osmotskom stresu (Rajashekar i sur., 1995.). Za simulaciju osmotskog stresa u hranjivi medij dodaje se manitol u različitim koncentracijama, a o stupnju otpornosti se zaključuje na temelju razlika u prirastu svježe mase eksplantata. Kad je riječ o selekciji podloga na otpornost prema povišenoj koncentraciji soli u tlu, i tu je bilo pokušaja primjene tehnike "in-vitro" (Ochatt i Power, 1989.). Pored manitola koji je imao funkciju simulacije "suše", bolje reći osmotskog stresa, korištene su različite

koncentracije NaCl, KCl i Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na čije se prisustvo testira otpornost. Iako su dobivene linije kalusnog tkiva istovremeno otporne na sve tri soli i manitol, regeneracija biljaka iz kalusnog tkiva nije uspjela. Treba raditi na prevladavanju ovog problema, jer navedena tehnika pruža velike mogućnosti i smanjuje troškove u odnosu na klasične metode selekcije.

Istraživanja organogeneze iz protoplasta kalusa (Ochatt, 1990.) pokazuju da dodatak hidrolizata kazeina stimulira rizogenezu, a ako mu se doda još i mješavina vitamina B, dolazi do direktne kaulogeneze. Ovo istraživanje pokazuje da regulatori rasta nisu jedine tvari potrebne za proces organogeneze, već je za njega potrebno osigurati i proteine i vitamine. Djelovanje regulatora rasta ovisi i o tome na kojem je mediju uzgajan eksplantat. Tako 2,4-D stimulira stvaranje izboja iz listova koji su uzeti s izboja koji su uzgajani u mediju za elongaciju, ali ne i iz onih koji su uzgajani na mediju za proliferaciju (Antonelli i Druart, 1990.). Djelovanje 2,4-D je bilo bolje kad je tretman trajao dva, umjesto četiri dana. Za ovaj tip kulture postoji razrađena receptura u smislu najpovoljnije temperature, svjetla, fotoperioda i izvora eksplantata za neke sorte jabuka i podloge za trešnju (Druart, 1990.a).

Postupci "in-vitro" nalaze vrlo važnu primjenu u bankama biljnih gena. Pomću njih je moguće čuvati velike količine materijala na relativno malom prostoru i, što je još važnije, u kontroliranim uvjetima. Nije stoga nimalo iznenađujuće što postoji dosta istraživanja u tom smjeru. Za čuvanje genofonda iz roda *Prunus* zadužena je Nordic Gene Bank for Agricultural and Horticultural Plants (NGB) u Alnaru u Švedskoj koju su zajednički osnovale Norveška, Danska, Finska, Island i Švedska. Za čuvanje biljnog materijala u banci gena koristi se uglavnom podloga MS bez NAA, piridoksina, HCl i glicina, s polovicom koncentracije makro i mikroelemenata, uz 30 g saharoze i 0,01 mg<sup>-1</sup> BA. Biljni materijal čuva se na sniženoj temperaturi, a prije stavljanja na dugotrajno čuvanje potrebno je provesti tri supkultiviranja (Eckard i sur., 1988.). Ima podataka (Eckhard, 1989.) da je regeneracija nakon čuvanja bolja ako se prije obavi tretman s kratkim danom (8 h) i niskim temperaturama (15/10 °C). Za čuvanje je najbolje uzeti vrhove izboja 1-1.5 cm duljine ili "rozete" od po tri izboja razmnožene "in-vitro", a čuvanje je najbolje provoditi na temperaturi od 2-4 °C. Treba napomenuti da je ovakav postupak još uvijek nepovoljan jer se ne može postići dulje čuvanje biljnog materijala. Zbog toga se radi na razvoju metoda krioprezervacije na super-niskoj temperaturi u tekućem dušiku (Suzuki, 1993.).

#### 4. ZAKLJUČAK

Iako na području razmnožavanja trešnje primjenom metoda "in-vitro" ima još uvijek dosta neriješenih problema, one nalaze sve širu primjenu kako u oplemenjivačkom radu tako i u komercijalnoj praksi. Posebnu primjenu ove metode nalaze u bankama biljnih gena jer omogućuju čuvanje velikih količina

materijala na relativno malom prostoru što im daje nesumnjivu prednost u odnosu na druge načine čuvanja. Sigurno je da će daljnja istraživanja doprinijeti razvoju biotehnoških metoda i da će one naći svoju primjenu i u drugim područjima u skoroj budućnosti.

## IN-VITRO PROPAGATION OF SWEET CHERRY (*Prunus avium* L.)

### SUMMARY

This paper is a literature review of "in-vitro" multiplication of sweet cherry. This technology nowadays become more interesting due to increased need for plant material caused by intensification of sweet cherry production. "In-vitro" technology received more attention for breeding of early cultivars and new rootstocks, and for application in banks of plant genes. The most important problems are choosing of explantate, conditions during the procedure, and medium composition.

Key words: sweet chery, in-vitro, problems, breeding, gene-bank

### LITERATURA - REFERENCES

1. Antonelli, M., Druart, P., 1990. The use of a brief 2,4-D treatment to induce leaf regeneration on *Prunus canescens* Bois, Acta Horticulturae 280: 45-50
2. De March, G., Grenier, E., Maiannay, N., Sulmont, G., David, H., David, A., 1993. Potential of somatic embryogenesis in *Prunus avium* immature zygotic embryos, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34(2):209-215
3. Druart, P., 1990a. Effect of culture conditions and leaf selection on organogenesis of *Malus domestica* cv. McIntosh "Wijcik" and *Prunus cerasus* Bois GM79, Acta Horticulturae 280:117-124
4. Druart, P., 1990b. Improvement of somatic embryogenesis of the cherry dwarf rootstock Inmil/GM9 by the use of different carbon sources, Acta Horticulturae 280: 125-129
5. Eckhard, A., 1989. Untersuchungen zur entwicklung einen rationellen Methode der In-vitro-Depothaltung von Kern- und Steinobst unter Kühlbedingungen, Archiv für Gartenbau 37(2): 131-140
6. Eckhard, A., Hanke, V., Küne, U., Förster, K., Nahlowsky, T., 1988. In-vitro-Langzeitanlagerung bei Obst – grundlage für den Aufbau einer genbank, Gartenbau 35(6): 178-180
7. Friedrich, A., Vondráček, P., Váchová, J., 1995. Explantátové kultury ovocných dřevin v radiomutačním šlechtění, Vědecké Práce Ovocnářské 14: 105-108
8. Hoefler, M., Hanke, V., 1990. Induction of androgenesis in-vitro in apple and sweet cherry, Acta Horticulturae 280: 333-336
9. Janečková, M., Blažková, J., Myslivečková, J., 1994. Využití in-vitro technik v novošlechtění raných třešní, Zachradnictví 21(1): 11-15
10. Long, C., M., Mulinix, C., A., lezzoni, A., F., 1994. Production of a microspore-derived callus population from sweet cherry, HortScience 29(11): 1346-1348

11. Mante, S., Scorza, R., Cordts, J., M., 1989. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica* and *Prunus cerasus*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19(1): 1-11
12. Ochatt, S., J., 1990. Plant regeneration from root callus protoplasts of sour cherry (*Prunus cerasus* L.), *Plant Cell Reports*, 9(5): 268-271
13. Ochatt, S., J., Power, J., B., 1989. Selection for salt and drought tolerance in protoplast- and explant-derived tissue cultures of Colt cherry (*Prunus avium* x *pseudocerasus*), *Tree Physiology* 5(2): 259-266
14. Rajashekar, G., Palmquist, D., Ledbetter, C., A., 1995. In-vitro screening procedure for osmotic tolerance in *Prunus*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41(2): 159-164
15. Schmidt, H., Kardel-Meisner, U., 1992. Adventivprossregeneration in-vitro bei Kirschen. III. Adventivprossbildung an Kotyledonen Von Süßkirschensorten, *Gartenbauwissenschaft* 57(6):267-270
16. Schmidt, H., Ketzler, A., 1993. Adventivprossregeneration in-vitro bei Kirschen. IV. Ansatz der Adventivprossregeneration an Kotyledonen und "embryo rescue" in der Kirschzüchtung, *Gartenbauwissenschaft* 58(2): 64-67
17. Suzuki, T., 1993. Basic studies on super-low temperature cryopreservation of horticultural plant tissues, *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University* 18(2):165-217
18. Theiler-Hedtrich, R., 1990. Induction of dwarf F-12/1 cherry rootstocks by in-vitro mutagenesis, *Acta Horticulturae* 280: 367-374
19. Webster, A., D., 1996. Propagation of sweet and sour cherries. In: *Cherries – Crop Physiology, Production and Uses*, Eds. Webster, A., D. and Looney, N., E., CAB International, Wallingford, Oxon: str. 187-192
20. Zdruikovskaya-Rikhter, A., I., 1989. Effect of nutrient medium containing extracts of plant origin on embryos of sweet cherry in *in-vitro* culture, *Byulleten' glavnogo Botanicheskogo Sada* 154. 86-91.

**Adresa autora – Authors' addresses:**

Mr. sc. Tomislav Jemrić  
Zavod za voćarstvo  
Agronomski fakultet  
Svetošimunska 25  
10 000 Zagreb  
E-mail: tjemric@agr.hr

**Primljeno – Received:**

08. 10. 2001.