

Utjecaj različitih šećera i citokinina na mikropropagaciju kupine sorte 'Reuben'

Sažetak

Cilj istraživanja bio je utvrđivanje protokola za mikropropagaciju kupine sorte 'Reuben'. Vegetacijski vršci izolirani su aseptično pod stereomikroskopom iz aksilarnih pupova i postavljeni na medij za uspostavljanje kulture (EM). Na mediju za proliferaciju (PM) ispitan je utjecaj šećera u dvije varijante: s dodanih 30 g L⁻¹ saharoze ili 20 g L⁻¹ glukoze + 10 g L⁻¹ saharoze. Da bise utvrdila optimalna vrsta i koncentracija citokinina za mikropropagaciju, u drugom pokusu ispitan je 5 tretmana: 6-benzilaminopurin (BAP) u koncentracijama 1 mg L⁻¹ i 0,3 mg L⁻¹, meta-topolin (mT) u jednakim koncentracijama te kao kontrola, medij bez hormona. Zakorjenjivanje *in vitro* provedeno je u dvije varijante, na mediju s dodanom indolil-3-octenom kiselinom (IAA) u koncentraciji 1 mg L⁻¹ i na mediju bez hormona. Najveći broj izdanaka po eksplantatu (2,6) dobiven je na mediju s 1 mg L⁻¹ BAP-a, ali su oni ujedno bili najkraći. Najdulji izdanci dobiveni su na mediju s 0,3 mg L⁻¹ BAP-a ili mT kao i na mediju bez hormona. Postotak zakorjenjivanja bio je viši (61%) na mediju za zakorjenjivanje bez hormona. Aklimatizacija je bila uspješna i iznosila 92%-95%, ovisno o mediju za zakorjenjivanje.

Gljučne riječi: *in vitro* proliferacija, šećer, 6-benzilaminopurin, meta-topolin

Uvod

Sorta kupine 'Reuben' dobivena je 2005. godine u Fayettevilleu (SAD) iz križanja ženskog roditelja kupine 'A-2292T' i muškog roditelja kupine 'APF-44'. Sjeme iz ovog križanja otpremjeno je u Veliku Britaniju gdje su 2006. godine sjemenke posijane na polju, a u jesen iste godine jedna sadnica, označena kao HPB3 ('Reuben'), odabrana je zbog cvatnje i plodonosnja na jednogodišnjim izdancima (primocane) te zbog visoke kvalitete i veličine ploda. 'Reuben' je sorta povećanog vigora, vrlo uspravnog (Slika 1a) i kompaktnog rasta (Clark i Fairlie, 2013) zbog čega se može saditi na razmak od 50 cm unutar reda.

Za razliku od sorata kupina koje plod donose tek na dvogodišnjim izdancima (floricane), sorta 'Reuben' može dati plod i na dvogodišnjim i na jednogodišnjim izdancima. Na dvogodišnjim izdancima sorta cvate (Slika 1b) i donosi plod vrlo rano, a na jednogodišnjima koji izrastu tijekom godine, u kasno ljeto i jesen. Ako se želi postići samo jedan kasni rod, izdanci se mogu tijekom zime posjeći u razini tla, a na novima koji će potjerati u proljeće, u kasno ljeto i tijekom jeseni (sve do mraza) može se očekivati obilan urod. Mladi izdanci su bez trnja, a stariji dvogodišnji imaju mali broj trnova po sebi.

Kupine se razmnožavaju vegetativno reznicama, položenicama ili dijeljenjem grma. U rasadnicima je, međutim, uobičajeni način razmnožavanja kupina mikropropagacijom. Mikropropagacija (mikrorazmnožavanje) je razmnožavanje određenog genotipa *in vitro* tehnikama uz očuvanje genetske stabilnosti.

1 prof. dr. sc. Snježana Kereša, doc. dr. sc. Ivanka Habuš Jerčić, doc. dr. sc. Kristina Batelja Lodeta, prof. dr. sc. Marijana Barić,
prof. dr. sc. Marija Pecina, doc. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Svetišimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska
2 Martina Zec, mag. ing. agr. studentica, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Svetišimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska
Autor za korespondenciju: skeresaa@agr.hr



Slika 1. Kupina sorte 'Reuben' posađena iz mikropropagairane sadnice: (a) uspravan rast i (b) cvjetni pup krajem ožujka

Figure 1. Micropropagated blackberry 'Reuben' planted under field conditions: (a) erect growth and (b) floral bud at the end of March

Postoji nekoliko načina mikropropagacije, a za kupinu se uobičajeno koristi mikropropagacija aksilarnim grananjem što podrazumijeva rast novih izdanaka iz postojećih meristema u pazušcima lisnih primordija pupa nakon što se eksplantat (pup ili nodij ili dio stabljike s više nodija) položi u hranidbeni medij s odgovarajućim regulatorima rasta (hormonima).

U tu svrhu koriste se citokinini koji sprječavaju apikalnu dominaciju i potiču istovremeni rast više izdanaka (George i de Klerk, 2007). Supkultivacijama tj. odvajanjem nastalih mikroizdanaka i njihovim prijenosom na svježi hranidbeni medij s regulatorima rasta, multiplikacija izdanaka se ponavlja. Nakon proizvodnje dovoljnog broja mikroizdanaka, iste je potrebno zakorijeniti.

Protokoli za mikropropagaciju razvijeni su za različite sorte kupina (Bobrowski et al., 1996; Ružić i Lazić, 2006; Fira et al., 2014; Kefayti et al., 2018). Iako se i kupina sorta 'Reuben' vjerojatno mikropropagira u velikim europskim i američkim rasadnicima, podatci o tome nisu dostupni.

Cilj rada bio je (1) utvrditi utjecaj različitog sastava šećera u podlozi na mikropropagaciju kupine sorte 'Reuben'; (2) istražiti uspješnost mikropropagacije na MS hranidbenom mediju s različitim citokininima i u različitim koncentracijama; (3) procijeniti uspješnost *in vitro* zakorjenjivanja kupine i naknadne aklimatizacije.

Materijali i metode

Uspostavljanje *in vitro* kulture i mikropropagacija

Mediji za uspostavljanje kulture i početnu proliferaciju izdanaka prikazani su u tablici 1. Nakon dodavanja Bacto agara (Difco), mediji su sterilizirani u autoklavu 25 min na 121°C pri tlaku od 1 bara. Izdanci kupine 'Reuben' sakupljeni krajem siječnja rezani su na duljinu oko 5

cm i podvrgnuti površinskoj sterilizaciji. Biljni materijal je najprije ispiran tekućom vodom iz slavine 30 minuta. Sterilizacija je obavljena tretiranjem izdanaka 70%-tnim alkoholom 2 minute i nakon toga 3%-tnom otopinom Izosana G (Pliva) 15 minuta. Otopini Izosana G dodano je nekoliko kapi detergenta Tween 20 (okvašivač) za smanjenje površinske napetosti. Biljni materijal je potom ispran 3 x 5 minuta u sterilnoj destiliranoj vodi u koju je dodana askorbinska kiselina u koncentraciji 150 mg L⁻¹.

Vegetacijski vršci veličine 0,5-1 mm izolirani su aseptično pod stereomikroskopom iz aksilarnih pupova i postavljeni na medij za uspostavljanje kulture (EM - eng. *Establishment Medium*). Izdanci su potom dva puta supkultivirani na EM 1 mediju prije proizvodnje dovoljnog broja izdanaka za postavljanje pokusa. Koncentracija željeza u EM 1 mediju udvostručena je u odnosu na EM medij, a promijenjen je i sastav regulatora rasta (Tablica 1).

Tablica 1. Sastav medija za uspostavljanje kulture i početnu proliferaciju izdanaka
Table 1. Media composition for culture establishment and initial shoot proliferation

Medij/Medium	Sastav medija/Media composition
MS HFM	MS makro- i mikroelementi (Murashige i Skoog, 1962), MS vitamini, 0,1 g L ⁻¹ inozitola, 30 g L ⁻¹ saharoze, 8 g L ⁻¹ Bacto-agar (Difco), pH 5,8
EM	MS HFM + 0,7 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 g L ⁻¹ aktivnog ugljena
EM 1	MS HFM s 2 x FeSO ₄ ·xH ₂ O, 1 mg L ⁻¹ BAP, 0,1 mg L ⁻¹ indolil-3-maslačne kiseline (IBA), 0,1 mg L ⁻¹ giberelinske kiseline (GA3)

U prvom pokusu, u kojem je ispitivan utjecaj različitog sastava šećera na učinkovitost aksilarnog grananja tj. proliferaciju izdanaka iz postavljenih eksplantata (mikroizdanci duljine 0,5-1 cm), MS medij je dodatno modificiran (PM) te je sadržavao 2 x FeSO₄·xH₂O i 2 x KH₂PO₄ u odnosu na osnovni MS medij kao i MS vitamine, 0,1 g L⁻¹ inozitola, 8 g L⁻¹ Bacto-agara (Difco), a pH je bio prilagođen na 5,8. U medijima je variran sadržaj šećera pa je korištena ili samo saharoza ili glukoza + saharoza (Tablica 2). Na svaki od ovih medija postavljena su po 63 eksplantata (7 Magenti sa po 9 eksplantata).

Tablica 2. Sastav medija za ispitivanje utjecaja šećera na učinkovitost mikropropagacije
Table 2. Media composition for examining effects of sugar type on micropropagation efficiency

Medij/Medium	Sastav medija/Media composition
PM SAH	PM, 1 mg L ⁻¹ BAP, 0,1 mg L ⁻¹ IBA, 0,5 mg L ⁻¹ GA3, 30 g L ⁻¹ saharoze
PM GLU+SAH	PM, 1 mg L ⁻¹ BAP, 0,1 mg L ⁻¹ IBA, 0,5 mg L ⁻¹ GA3, 20 g L ⁻¹ glukoze + 10 g L ⁻¹ saharoze

U drugom pokusu je ispitivana učinkovitost aksilarnog grananja tj. proliferacije izdanaka iz supkultiviranih mikroizdanaka duljine 0,5-1 cm s obzirom na vrstu i koncentraciju citokini-
na. Izdanci su zato bili postavljeni na PM medij s 30 g L⁻¹ saharoze i različitim citokininima: 6-benzilaminopurinom (BAP) ili *meta*-topolinom (*mT*). Dodatno, citokinini su bili varirani u dvije koncentracije (1 mg L⁻¹ ili 0,3 mg L⁻¹), a PM medij bez regulatora rasta (PM HFM) je služio kao kontrola (Tablica 3). Na svaki od ovih tretmana bilo je postavljeno od 54-63 eksplantata (6 ili 7 Magenta posudica sa po 9 eksplantata). Sve supkultivacije i mjerenja rađena su razmaku od 30 dana.

Tablica 3. Sastav medija za ispitivanje učinkovitosti mikropropagacije u ovisnosti o citokinima i njihovim koncentracijama

Table 3. Media composition for examining effects of different cytokinin types and concentrations on micropropagation efficiency

Tretmani/Treatments	Sastav medija/Media composition
PM HFM	PM + 30 g L ⁻¹ saharoze
PM BAP 1	PM HFM, 0,1 mg L ⁻¹ IBA, 0,5 mg L ⁻¹ GA3, 1 mg L ⁻¹ BAP
PM BAP 0,3	PM HFM, 0,1 mg L ⁻¹ IBA, 0,5 mg L ⁻¹ GA3, 0,3 mg L ⁻¹ BAP
PM mT 1	PM HFM, 0,1 mg L ⁻¹ IBA, 0,5 mg L ⁻¹ GA3, 1 mg L ⁻¹ mT
PM mT 0,3	PM HFM, 0,1 mg L ⁻¹ IBA, 0,5 mg L ⁻¹ GA3, 0,3 mg L ⁻¹ mT

Zakorjenjivanje mikropropagiranih izdanaka

Mikropropagirani izdanci duljine 1-1,5 cm odvojeni su iz grmiča i zakorjenjivani na PM HFM mediju ili PM HFM + 1 mg L⁻¹ indolil-3-octene kiseline (IAA). Faza zakorjenjivanja trajala je 50 dana. Sve faze rasta *in vitro* odvijale su se u komori rasta pri 22°C, fotoperiodu 16 sati dan/8 sati noć i intenzitetu svjetla od 40 μE m⁻²s⁻¹.

Sadnja u supstrat i aklimatizacija

Prije sadnje s korijenja je ispran medij za zakorjenjivanje. Biljke su nakon toga posađene u smjesu komposta (2/3) i perlita (1/3), prekrivene plastičnom prozirnom folijom te aklimatizirane u komori rasta na 20 °C, fotoperiodu 16 sati dan/8 sati noć i intenzitetu svjetla od 40 μE m⁻²s⁻¹.

Statistička analiza podataka

Pokusi su bili postavljeni po potpuno slučajnom rasporedu. Svojstva opažana (mjerena) u ovim pokusima bila su broj izdanaka po eksplantatu i duljina izdanaka (mm). Za analizu podataka provedena je jednofaktorska analiza varijance. Srednje vrijednosti uspoređene su LSD-testom na razini signifikantnosti P≤0,05. Statistička analiza podataka provedena je programskim paketom SAS (SAS/STAT® 9.4 software).

Rezultati i rasprava

Uspostavljanje *in vitro* kulture

Na medij za uspostavljanje kulture, svaki u zasebnoj epruveti pokrivenoj vatom i aluminijskom folijom, bila su postavljena ukupno 23 aseptično izolirana vegetacijska vrška kupine. Aktivni ugljen u EM mediju korišten je kako bi adsorbirao otpuštene fenolne tvari iz vegetacijskih vršaka jer njihova oksidacija često dovodi do nekroze postavljenih eksplantata. Devet dana nakon uvođenja u *in vitro* kulturu vegetacijski vršci su supkultivirani (Slika 2) na medij s povećanom koncentracijom regulatora rasta te udvostručenom koncentracijom željeza (EM 1). Koncentracija željeza je udvostručena iz razloga jer su vrlo rano, tijekom formiranja rozete, primijećeni znakovi kloroze. Slično ovome, kloroza izdanaka kupine pojavila se u istraživanju Ružić i Lazić (2006) s jednom od dvije mikropropagirane sorte kupine te je također kao mjera bila primijenjena udvostručena koncentracija željeza u mediju. Na ovom mediju za proliferaciju svi eksplantati su nastavili rasti i aksilarno granati proizvodeći u prosjeku 2,8 izdanaka po eksplantatu.



Slika 2. Mikroizdanci na EM 1 mediju
Figure 2. Microshoots on EM 1 medium

Utjecaj različitog sastava šećera u podlozi na mikropropagaciju

Dvostruka koncentracija željeza u EM 1 mediju smanjila je probleme s klorozom listova. Ipak, nakon 2-3 tjedna od supkultivacije rubovi listova poprimali su crveno-smeđu boju. Pretpostavka je da je uzrok toj pojavi na listu manjak fosfora zbog čega je u PM mediju za nastavak pokusa udvostručena i koncentracija KH_2PO_4 makro soli.

Analiza varijance pokazala je da je različit sastav šećera u mediju značajno utjecao na svojstva duljine izdanaka - najdulji izdanak i prosječnu duljinu svih izdanaka, ali nije imao signifikantan učinak na broj izdanaka po eksplantatu. Duljina najduljeg izdanaka, kao i prosječne duljine svih izdanaka bile su značajno veće na mediju koji je sadržavao glukozu i saharozu (PM GLU+SAH) (Tablica 4). U istraživanju mikropropagacije hrasta plunjaka (Romano i sur. 1995) broj izdanaka s medija koji su sadržavali glukozu bio je podjednak broju izdanaka s medija kojem je dodana saharoza što je sukladno našim rezultatima. Međutim, u spomenutom istraživanju hrasta plunjaka saharoza je bila bolja u izduživanju izdanaka, dok je kod kupine duljina izdanaka bila veća kad je medij uz saharozu sadržavao i glukozu. Rezultati upućuju na to da je kombinacija glukoze i saharoze imala pozitivan učinak na mikropropagaciju kupine sorte 'Reuben' i može se preporučiti.

Tablica 4. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o sadržaju šećera u mediju

Table 4. Average values of analysed micropropagation growth traits depending on sugar composition in medium

Sadržaj šećera u mediju/ Sugar composition in medium	Broj izdanaka po eksplantatu/ Number of shoots per explant	Duljina najduljeg izdanaka/ Length of the longest shoot (mm)	Prosječna duljina izdanaka/ Average length of shoots (mm)
PM SAH	2,7 a*	5,2 b	4,2 b
PM GLU+SAH	3,0 a	6,4 a	5,1 a

*vrijednosti označene istim slovom unutar kolone ne razlikuju se značajno

Utjecaj citokinina i njihovih koncentracija na mikropropagaciju

Jednofaktorska analiza varijance provedena kako bi se utvrdio učinak tretmana na svojstva mikropropagacije pokazala je da tretmani značajno utječu na sva tri svojstva. Najveći broj izdanaka po eksplantatu (2,6) dobiven je korištenjem BAP-a u koncentraciji 1 mg L^{-1} medija (Tablica 5.). Tretman s koncentracijom BAP-a $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ i mediji s *meta*-topolinom (obje koncentracije) kao i medij bez hormona dali su značajno manji broj izdanaka po eksplantatu. Slične indekse multiplikacije izdanaka (od 1,46-2,45) kod sorte kupine 'Čačanska bestrna' dobili su Ružić i Lazić (2006) koristeći MS medij s dodatkom BAP-a u koncentraciji 0,5 ili 1 mg L^{-1} + GA3 0,1 mg L^{-1} + IBA ili NAA 0,1 mg L^{-1} .

Na PM BAP 1 mediju koji je dao najveći broj izdanaka po eksplantatu, duljine izdanaka bile su, međutim, najmanje (Tablica 5). Kod nižih koncentracija bilo kojeg od dvije vrste citokinina (BAP-a ili *mT*) izdanci su bili značajno dulji nego u tretmanu s 1 mg L^{-1} citokinina. Ovi rezultati su slični rezultatima istraživanja koje su proveli Ružić i Lazić (2006) te Fira i sur. (2014) gdje se povećanjem koncentracije citokinina značajno povećala proliferacija, a duljina izdanaka je značajno smanjena. Svi tretmani u ovom pokusu sadržavali su giberelinsku kiselinu (GA3) u koncentraciji $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Giberelinska kiselina dodana je u medij zbog prije dokazanog pozitivnog učinka na izduživanje izdanaka (Azazi Gonbad i sur., 2014). U ovom radu usprkos korištenju GA3 u mediju izdanci su bili kratki, a moguće je da je u ovako relativno visokoj koncentraciji GA3 uzrokovala manju proliferaciju izdanaka kao što su dokazali Kefayeti i sur. (2019) na kupini sorte 'Chester thornless'. Izdanci propagirani na BAP-u. Iz svega navedenog može se zaključiti da je BAP u koncentraciji 1 mg L^{-1} bio najučinkovitiji u poticanju aksilarnog grananja kupine sorte 'Reuben'. Više koncentracije (1,5 ili 2 mg L^{-1}) dale bi i veći broj izdanaka, koji bi, međutim, bili još kraći. Kultiviranjem izdanaka s viših koncentracija BAP-a 2-3 tjedna na mediju s $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ *mT* prije zakorjenjivanja povećala bi se njihova dužina što bi moglo djelovati pozitivno na zakorjenjivanje.

Tablica 5. Prosječne vrijednosti analiziranih svojstava mikropropagacije ovisno o vrsti i koncentraciji citokinina (tretmani)

Table 5. Average values of analysed micropropagation growth traits depending on cytokinin types and concentration (treatments)

Tretmani/Treatments	Broj izdanaka po eksplantatu/ Number of shoots per explant	Duljina najduljeg izdanka/ Length of the longest shoot (mm)	Prosječna duljina izdanaka/ Average length of shoots (mm)
PM HFM	0,8 c	8,8 a	11,0 a
PM BAP 1	2,6 a	5,1 b	4,2 d
PM BAP 0,3	2,0 b	8,9 a	8,0 b
PM <i>mT</i> 1	1,6 b	6,2 b	5,6 c
PM <i>mT</i> 0,3	1,7 b	8,3 a	7,4 b

*vrijednosti označene istim slovom unutar kolone ne razlikuju se značajno prema LSD testu



Slika 3. Izdanci dobiveni aksilarnim grananjem na PM mT 0,3
Figure 3. Shoots produced by axillary branching on PM mT 0.3

Zakorjenjivanje i aklimatizacija mikropropagiranih izdanaka

Uspješnost zakorjenjivanja bila je 61% na mediju bez hormona (PM HFM), a svega 41% na mediju s dodatkom IAA (PM HFM + 1 mg L⁻¹ IAA). Korijenje je bilo dugačko i dovoljno razgranato (Slika 4a). Uspješnost zakorjenjivanja na PM HFM mediju usporediva je s postotkom *ex vitro* zakorijenjenih (*in vitro* propagiranih) izdanaka kupine sorata „Chester Thornless“ i „Čačanska bestrna“ (Fira i sur., 2014). Međutim, ovaj postotak zakorijenjenih izdanaka nije zadovoljavajući te protokol zakorjenjivanja treba još optimizirati. Međukorak izduživanja izdanaka prije zakorjenjivanja mogao bi pomoći. Zbog dobro razvijenog korijenja uspješnost aklimatizacije bila je vrlo visoka (Slika 4b). Aklimatizaciju je preživjelo 92% biljaka zakorijenjenih na mediju bez regulatora rasta (PM HFM) i 95 % biljaka zakorijenjenih na mediju s dodatkom IAA.



Slika 4. (a) *In vitro* zakorijenjena biljka na mediju bez hormona i **(b)** aklimatizirane biljke u komori rasta

Figure 4. (a) *In vitro* rooted plantlet on medium without hormones and **(b)** plants acclimatised in growth chamber

Zaključak

Temeljem dobivenih rezultata istraživanja možemo zaključiti da su vrsta šećera kao i vrsta i koncentracija citokinina važni čimbenici koji određuju uspješnost mikropropagacije kupine sorte 'Reuben'. Kombinacija glukoze i saharoze u hranidbenom mediju dala je duže izdanke od same saharoze, ali nije imala utjecaj na broj izdanaka. Citokinin BAP u koncentraciji 1 mg L⁻¹ bio je učinkovitiji u poticanju aksilarnog grananja od drugih tretmana, ali su izdanci na spomenutom tretmanu bili najkraći. Viši postotak zakorjenjivanja (61%) postignut je na mediju bez hormona u odnosu na medij s dodatkom IAA. Aklimatizacija je bila vrlo uspješna i iznosila 92–95%, ovisno o mediju za zakorjenjivanje. Kako bi se postigla bolja proliferacija izdanaka potrebno je istražiti više koncentracije citokinina u mediju (1,5 ili 2 mg L⁻¹). One bi vjerojatno dale veći broj izdanaka po eksplantatu koji bi, međutim, bili još kraći. Međukorak izduživanja izdanaka na mediju s niskom koncentracijom mT prije zakorjenjivanja mogao bi biti rješenje ovog problema.

Literatura

- Azadi Gonbad, R., Sinniah, UR., Abdul Aziz, M, Rosfarizan Mohamad, R. (2014) Influence of cytokinins in combination with GA3 on shoot multiplication and elongation of tea clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Scientific World Journal*, Article ID 943054.
- Borowski, V., Mello-Farias, P. C., Peters, J. A., (1996) Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. *Revista Brasileira de Agrociência* 2 (1): 17-20.
- Clark, J.R., Fairlie, J. (2013) Blackberry Plant Named 'Reuben'. United States Plant Patent No.: US PP23,497 P3. <https://patentimages.storage.googleapis.com/05/96/d3/9e916c1291850e/USPP23497.pdf> – (15.03.2019).
- Fira, A., Clapa, D., Simu, M. (2014) Studies Regarding the micropropagation of some blackberry cultivars. *Bulletin UASVM Horticulture* 71 (1): 22-37.
- George, E.F., de Klerk, G-J. (2008) Micropropagation: Uses and methods. U: George i sur., ur. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, 29-64. Springer.
- Kefayeti, S., Kafkas, E., Ercisli, S. (2018) Micropropagation of 'Chester thornless' blackberry cultivar using axillary bud explants. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 47(1):162-168.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473-497.
- Romano, A., Noronha, C., Martins-Loução, M. A. (1995) Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 159-167.
- Ružić, Dj., Lazić, T. (2006) Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 71 (4): 149-153.
- SAS/STAT® software Version [9.4] 2002-2012. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Prispjelo/Received: 1.4.2019.

Prihvaćeno/Accepted: 6.5.2019.

Original scientific paper

Influences of different types of sugar and cytokinin on micropropagation of blackberry cultivar 'Reuben'

Abstract

The aim of the present study was to establish the protocol for micropropagation of blackberry cultivar 'Reuben'. Using stereomicroscope, shoot tips were isolated from axillary buds and placed on medium (EM) to establish aseptic culture. The effect of different sugars in proliferation medium (PM) in the two variants: 30 g L⁻¹ sucrose or 20 g L⁻¹ glucose + 10 g L⁻¹ sucrose was tested. In order to establish optimal constitution of cytokinins, in second experiment 5 treatments were tested: 6- benzylaminopurine (BAP) in concentration of 1 mg L⁻¹ and 0.3 mg L⁻¹ and meta-Topoline (mT) in the same concentrations, as well as a control hormone free medium. In vitro rooting was carried out in two experimental variants, on IAA added rooting medium and on hormone free medium. The greatest number of shoots/explant (2.6), but in the same time the shortest shoots, were produced on medium containing 1 mg L⁻¹ BAP. Maximum shoots length was produced on medium containing 0.3 mg L⁻¹ BAP or mT as well as on medium without hormones. The rooting percentage was higher (61%) on hormone free rooting medium.

Acclimatization was very successful reaching 92% -95%, depending on rooting medium.

Keywords: in vitro proliferation, sugar, 6- benzylaminopurine, meta-Topoline