

NDIKIMI I DISA AUKSINAVE NË RRËNJËZIMIN “IN VITRO” TË KULTIVARËVE TË HARDHISË

EFFECT OF SOME AUXINS ON “IN VITRO” ROOTING OF GRAPEVINE CULTIVARS

EDLIRA KUKALI^a, EFIGJENI KONGJIKA^b

^aDepartamenti i Hortikulturës, Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit, Universiteti Bujqësor i Tiranës

^bAkademia e Shkencave e Shqipërisë

Email: edlirakukali@yahoo.com

ABSTRACT

Some data on the effect of auxins, indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) on the rhizogenesis of two autochthonous grapevine cv, Sheshi i Zi and Vlosh. The plantlets developed from axillary buds during “in vitro” culture are transferred in compared with untreated plantlets. The most appropriate auxin is shown IBA. The auxin, IAA has led to the callus formation and the lowest rooting percentage. The average percentage of the rooting of the two cultivars, Shesh i Zi and Vlosh in the presence of IBA has been 63.5%, under the IAA treatment 43%, while in the control medium only 6.3%. The micropropagation protocol is considered the base to establish “in vitro” genetic bank of grapevine germplasm.

Keywords: grapevine cultivars, “in vitro” culture, auxins, rooting medium, rhizogenesis.

PËRMBLEDHJE

Në artikull jepen të dhëna për efektin e auksinave, acid indol-3-acetik (AIA) dhe acid indol-3-butirik (AIB) në rrënjëzimin e disa cv. autoktone të hardhisë, Sheshi i Zi dhe Vlosh. Bimëzat e zhvilluara nga sythet sqetullore, të kultures “in vitro”, transferohen në terrene rrënjëzimi. Në terrenin e kontrollit (pa auksina), ndodhin rrënjëzime spontane me frekuencë të ulët, shtimi i auksinave, veçanërisht në dozen 1 mg l⁻¹, ka nxitur rrënjëzimin dhe ka shtuar nr mesatar të rrënjëve për bimëza, në krahasim me ato të pa patrajtuara. Auksina më e përshtatshme ka rezultuar AIB. Auksina AIA, ka çuar në formimin e kallusit e në përqindje më të ulët rrënjëzimi. Përqindja mesatare e rrënjëzimit e të dy kultivarëve, Sheshi i Zi dhe Vlosh, në prani të AIB arrin në 63.5%, në trajtim me AIA – 43%,

rooting media. Although spontaneous rooting with relatively low frequency occurs in the control medium (without auxins), the adding auxins, especially in the dose 1 mg l⁻¹, stimulated the rhizogenesis and increased the average number of roots per plantlet

në terrenin e kontrollit vetëm 6.3%. Protokoli i mikroshumimit konsiderohet bazë për ngritjen e nje banke gjenetike “in vitro” e germoplazmes te hardhisë.

Fjalë kyç: kultivarë të hardhisë, kultura “in vitro”, auksina, terren rrënjëzimi, rizogjeneza

HYRJE

Mikroshumëzimi, një metodë e stabilizuar për rigjenerimin “in vitro” të hardhisë, zakonisht nëpërmjet kulturës së majave apo nëpërmjet formimit të sythit, garanton material bimor të pastër në aspektin shëndetësor, të shpejtë dhe mjaft ekonomik. Studimi i ka kushtuar rëndësi standartizimit morfologjik, sidomos aftësi rizogjenike si bazë për kalimin në zbatimin e metodave të mikroshartimeve “in vitro” në praktikën e punës për riprodhimin dhe ruajtjen “ex situ”. Studimi është kryer në Institutin e Kërkimeve Biologjike (sot Departamenti i Bioteknologjisë) në periudhën 2006 – 2009.

Robbins (1922) është personi i parë, që ka realizuar në mënyrë të suksesshme kultivimin e majave të bisqeve në një terren me përmbajtje sheqeri (George et al., 2008). Eksplante majash nga 1.75-3.75 mm u morën nga bizelja, misri dhe pambuku dhe u vendosën në një terren të lëngshëm. Pasi kulturat u mbajtën në errësirë, bisqet e prodhuara kishin gjethe të vogla, klorolitike dhe me rrënjë të shumta. Megjithatë këto rezultate, evidentuan potencialin e kulturës së sytheve, për shumimin e shpejtë të bimëve në errësirë,

shpejtesia e shumimit të bisqeve do të varet nga zhvillimet e mëvonshme. Për rreth 20 vite pati një progres shumë të ngadalshëm në kulturën e sytheve. White (1933), si pionier i kulturave indore të bimëve, eksperimentoi me maja meristemash (0.1mm ose më pak) te *Stellaria*, të rritura, vetëm në pika të tretësirës ushqyese. Gjatë një periudhe 6 javore u zhvilluan fillësa të gjethes ose lules. Një kulturë e këtij lloji u realizua dhe nga La Rue (1936). Eksplantet e tij përbëheshin nga pjesa bazale dhe e sipërme e embrioneve të farave. Megjithatë, meristemat apikale të disa bimëve u rritën për të prodhuar bimë.

Rritje sinjifikante e bisqeve, nga eksplantet e majave vegjetative të bisqeve, u realizua fillimisht nga Loo (1945-1946). Majat e bisqeve të *Asparagus*, 5-10 mm të gjata, u mbajtën në terren të lëngshëm dhe më vonë u rritën në një substrat të ngurtësuar. Loo arriti në disa përfundime interesante:

-Rritja varet nga përqëndrimi i sheqerit, nivele më të larta janë më të nevojshme në errësirë sesa në dritë;

-Eksplantet mund të rriten në mënyrë të kënaqshme në agar 0.5%;

-Rritja e bisqeve "in vitro" mund të vazhdojë pambarim (35 transferime u bënë gjatë 22 muajve);

-Kultura e majës së biskut u gjet si një mënyrë për të shumuar materialin bimor (klonet u krijuan nga disa maja bisqesh të izoluar).

Këto eksperimente nuk përparuan, sepse nuk u arrit rrënjëzimi në kulturat e bisqeve të *Asparagus*. Merita për evidentimin e parimeve të kulturës moderne të bisqeve, ndahet midis Loo dhe Ball. Ball (1946) ishte i pari, që prodhoi bisqe të rrënjëzuara nga kulturat e majave të bisqeve. Eksplantet përbëheshin nga një meristemë apikale dhe 2-3 gjethë primordiale.

Gjatë disa viteve më pas, kultura e majës së biskut (ose majës së meristemës) ishte në interes vetëm të patologëve të bimëve, të cilët njohën rëndësinë e saj për prodhimin e bimëve të pafektuara nga viruset. Gjatë këtyre studimeve, Morel bëri zbulimin domethënës të formimit të protokormeve nga majat e bisqeve të orkidesë *Cymbidium*.

Dy zhvillimet më të mëdha që i bënë kulturat e sytheve të realizueshme ishin formulimi i terreneve të përmirësuar për kulturat indore bimore (Murashige & Skoog, 1962) dhe zbulimi i citokininave si një klasë e rregullatorëve bimorë të rritjes, me aftësi për të zgjuar sythet anësore nga qetësia.

Në dekadën më pas filluan raportime të shumimit të bimëve duke përdorur metodat e kulturave të sytheve. Haramaki (1971) përshkroi shumimin e shpejtë të *Gloxinia* nga kultura e sytheve dhe në 1972 u shfaqën raporte të ndryshme të mikroshumimit të suksesshëm me këtë metodë. Që atëherë numri i artikujve të publikuara çdo vit u rrit ndjeshëm dhe metodat u

përdorën gjerësisht për shumimin e bimëve të tregtuara. Faktorët ndikues në zgjedhjen e kulturave të sytheve për mikroshumim kanë qenë:

Mënyra me të cilën metoda mund të aplikohet në një rend të gjerë specimesh bimore të ndryshme, duke përdorur parime dhe metoda bazë të njëjta;

Mundësia e sigurimit të kontrollit të njëkohshëm të virusit;

Njëtrajtshmëri e përgjithshme dhe "kopje e tipit" të bimëve të rigjeneruara;

Mundësia e një përqindjeje relativisht e lartë të mikroshumimit në shumë specie.

MATERIALE DHE METODA

Materiali gjenetik për mikroshumëzimin kanë qenë cv. Shesh i zi, cv. Vlosh.

Izolimi, dezinfektimi dhe inokulimi i eksplanteve. Nyje dhe maja rritëse priten dhe lihen në ujë të rrjedhshëm, dezinfektohen me etanol 70% për 30 sek. shplahen, trajtohen me HgCl_2 0.1% për 20 min. Për çdo trajtim inokulohen nga 16 eksplante duke izoluar maja rritëse (3 mm gjatësi) dhe copa nyjesh (3-8 mm).

Terreni ushqyes

Të gjitha terrenet u plotësuan me 30 g l⁻¹ sakarozë dhe 7 g l⁻¹ agar. pH i terreneve u saktësua në vlerat 5.6 - 5.8 sipas llojit të terrenit. Si enë u përdorën tuba qelqi 150x24 mm, që përmbajnë 20 ml terren. Terrenet janë autoklavuar për 20 min në një presion prej 1 atm. dhe në temperaturë 121°C. Janë përdorur makroelementë, mikroelementë dhe vitamina. Përbërja e terrenit ndryshon vetëm në lidhje me përqëndrimin e hormoneve të rrënjëzimit, por gjithmonë duke përdorur një MS mesatare si bazë. Për fazën e mikrooptimit duke përfshirë subkultura suksesive çdo 45 ditë të sytheve sqetullore të përfutur nga filizat që prodhohen, shtohet vetëm IBA dhe AIA.

Stadi i rrënjëzimit. Terreni ushqyes i këtij stadi përkon me atë të proliferimit dhe të subkulturës me dallimin në llojin e fitohormoneve. Në këtë stad bisqet e zhvilluara "in vitro" trajtohen me auksinën acid indolbutirik AIB 0.1 mg l⁻¹ dhe giberelinën acid giberelik GA_3 0.1 mg l⁻¹, dhe acidi 3-indol acetik 0.1 mg l⁻¹.

Kushtet e inkubimit. Pas etiketimit me datën e kulturës, emrin dhe llojin e eksplantit, të gjitha kulturat vendosen në dhomën e kulturës me parametrat fizike të kontrolluar (temperatura 23° C ± 2° C, intensitet të ndriçimit 2000 luks dhe fotoperiodë 16 orë ndriçim/24 orë). Për çdo stad zhvillimi, kulturat mbahen rreth 4 javë. Ndrërimi është i siguruar nga tubat fluoeshente me dritë të bardhë me 30-35 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Aklimatizimi i bimëzave

Pas stadi të rrënjëzimit, bimëzat me 6-7 gjethë kalojnë në stadin e aklimatizimit, në dhë, torfë dhe perlit në

raport (2:1:1). Pasi u jiten mirë, bimëzat mbahen dy deri tre javë të mbuluara me polietilen në kushte të "mjegullimit" artificial për të siguruar lagështi relative ajrore të lartë në temperaturë 22° C dhe pastaj kalohen në vazo me dhé dhe torfë.

Treguesit e kërkimit

Ecuria e eksperimenteve dhe përcaktimi i potencialit rigjenerues dhe shumues gjykohej me anë të treguesve biometrikë. Materialet bimore "in vitro" fotografohen me kamera fotografike digjitale në stereomikroskop me program Microgiciel. Treguesit kryesor të kërkimit janë: Numri i eksplanteve me rrënjëza (%), numri i rrënjëzave të zhvilluara për explant, vlerësimi për çdo kultivar.

Analiza statistikore

Rezultatet të cilat u nevojitet nje analizë statistikore ishin subjekt të analizës se variancës dhe krahasimit Tukey të testit të mesatares si dhe korelacionit të mesatareve.

REZULTATET E ARRITURA

Kërkimet e kryera në periudhën 2006-2009, për mikroshumëzimin "in vitro" të kultivarëve të hardhisë Vlosh, dhe Shesh i zi, përbëjnë kërkimet e para në fushën e bioteknologjisë në vendin tonë.

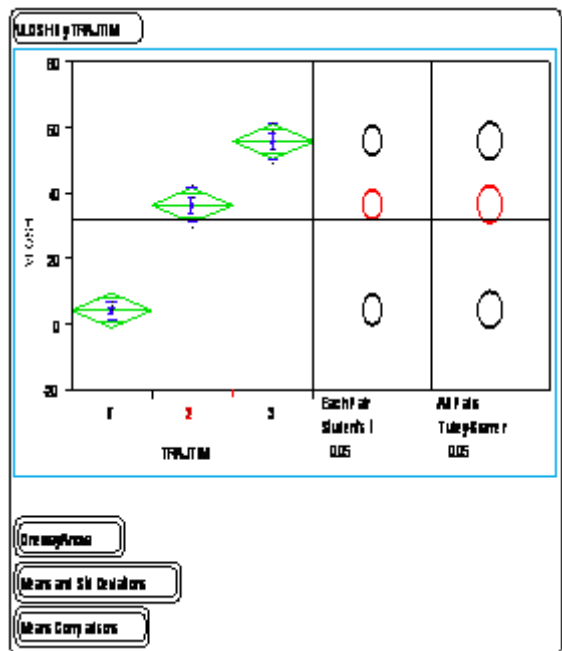
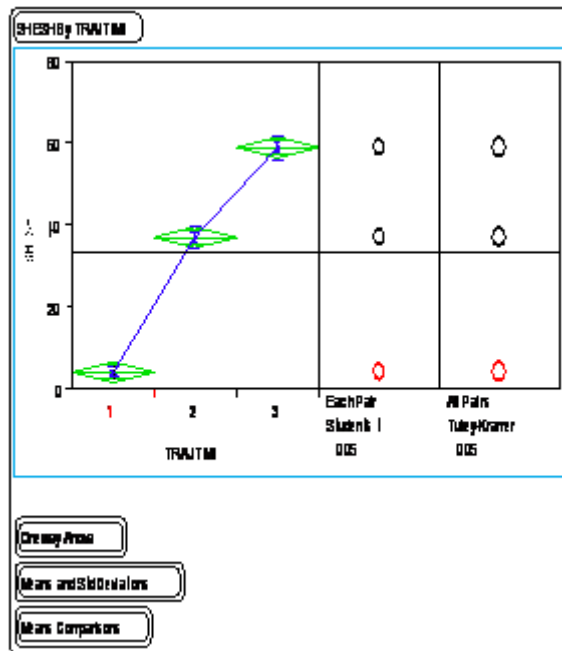
Nëpërmjet rezultateve të arritura është vërejtur koeficient i lartë shumëzimi, riprodhime homologe shumë te ngjashëm, pa modifikime gjenetike dhe të shëndetshme. Shumëzimi i materialit ka qenë i shpejtë në njësinë e kohës, nëpërmjet aplikimit te subbkulturave të ngjashme dhe është realizuar gjatë gjithë periudhës vjetore.

Rezultatet në kushtet tona janë inkurajuese për faktin tjetër të aplikimit të kërkimeve vijuese për zbatimin e shartimit jeshil si zëvendësues i kontrollit sanitar.

Nëpërmjet vazhdimit të protokollit të shumëzimit, aplikimi i dy stimulanteve sintetikë të rrënjëzimit AIB dhe AIA 1mg l⁻¹(pasq) ka nxitur përqindje më të lartë rrënjëzimi se në rastin e Kontrollit. Ndërkohë, përqindja më lartë e rrënjëzimit është arritur, kur është aplikuar AIB, reflektuar në numrin e rrënjëve Rezultatet e arritura vërtetojnë një diferencë të madhe të aftësisë së rrënjëzimit të dy kultivarëve të hardhisë nën ndikimin e dy hormoneve AIB, AIA 1 mg l⁻¹ dhe Kontrollit. Rezultate më të mira për përqindjen e rrënjëzimit janë shprehur në përqëndrimin 1mg l⁻¹ AIB, reflektuar ndërkohë dhe me numrin e rrënjëve të diferencuara në krahasim me përdorimin e AIA . Këto rezultate kanë qenë të ngjashme për të dy kultivarët e provuar.

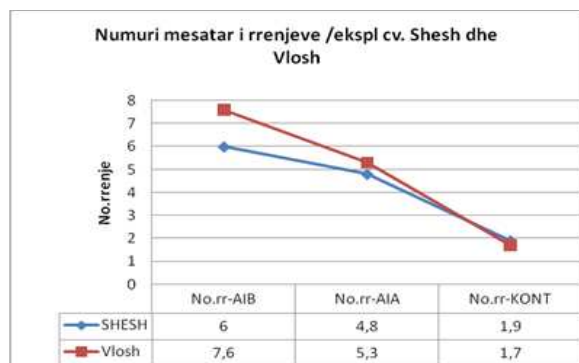
Përqëndrimet 1mg l⁻¹ AIB dhe 1mg l⁻¹ AIA, kanë ndikuar për diferencimin e numrit të rrënjëve në sasi më të madhe se në rastin e Kontrollit për çdo eksplant.

Eksplantet e dy kultivarëve të hardhisë nën trajtimin me AIB 1g l⁻¹ kanë dhënë 63.5% eksplante me rrënjëza, me AIA 1g l⁻¹ 43% dhe Kontrolli 6.3%.



Grafiku 1. Analiza e variancës për ndikimin e AIA, AIB, Kontrollit mbi rrënjëzimin e kultivarëve të hardhisë, (Testing Tukey).

Rezultatet e fituara prej dozës 1 mg l^{-1} të dy hormoneve kanë vërtetuar ndikimin e tyre në shtimin e aftësisë për rrënjëzim. Përqindja e rrënjëzimit në 1 mg l^{-1} AIB dhe AIA ka qënë përkatësisht 57% dhe 36.5% më mire se në rastin kur nuk është përdorur hormon sintetik. Përdorimi i dy hormoneve ka përmirësuar përqindjen e rrënjëzimit të filizave të gjelbër, riformimin e qelizave të reja të kallusit dhe parenkimes së rrënjëzave, të cilat kanë qene më të shumta në numër referuar kontrollit. Në eksplantet që nuk është përdorur hormon, qelizat e indit të kallusit janë formuar të shumta por nuk kanë arritur të diferencojnë emisione rrënjësh. Të dhënat e tre viteve për përqindjen e rrënjëzimit, në përqëndrimin 1 mg l^{-1} të AIB rezultojnë me ndryshime të vërtetuara për Lsd 2.26, me variantin AIA dhe Kontroll. Kultivari Vlosh paraqet ndryshime sinjifikative me cv Shesh i zi.

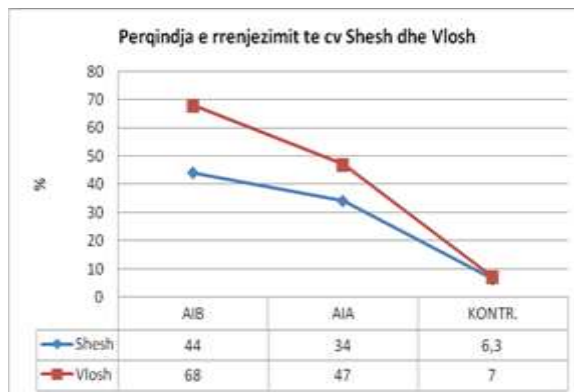


Grafiku 2. Numri mesatar i rrënjëve për explant

Referuar test Tukey-Kramer, për Lsd 2.79 vërtetohet se cv Vlosh me përqindje të lartë rrënjëzimi, ka vlera pozitive më të dukshme. Në pasqyrën e vlerave duket devijimi i secilës ndaj mesatares, përcaktuar si diferencë e cdo vlere dhe është vërtetuar se nuk ka patur ndryshime ndërmjet mesatareve vjetore brenda cdo trajtimi.

Në trajtimin Kontroll; referuar Test Student dhe Tukey-Kramer për alpha 0.05 për përqindjen e rrënjëzimit të cv Shesh i Zi paraqet ndryshime të theksuara ndaj cv. Vlosh. Duke krahasuar përqindjen e rrënjëzimit të kultivarëve, brenda një trajtimi hormonal, IBA ka dhënë përqindje rrënjëzimi më të lartë se në dy tretësirat e tjera dhe pa ndryshime të dukshme për Lsd 2.26. Efektet e përqëndrimit 1 mg l^{-1} të AIA dhe AIB kanë rezultuar me ndryshime statistikore për përqindjen e rrënjëzimit, në krahasim me Kontrollin. Referuar Tukey-Kramer mbi analizën e mesatareve të trajtimeve, përdorimi i AIA për kultivarin Shesh i Zi ka

patur përqindje rrënjëzimi të ulët dhe me ndryshime statistikore në cdo trajtim të aplikuar.



Grafiku 3. Përqindja e rrënjëzimit për secilin cultivar

Të dy kultivarët e hardhisë në përqëndrimin 1 mg l^{-1} AIB, rrënjëzuan mesatarisht 63.5%, ndërsa në AIA 43 % kundrejt Kontrollit 6.5 %. Kultivarët kanë shprehur ndryshime dhe tendencë rrënjëzimi maksimale në tretësirën e AIB 1 mg l^{-1} , vërtetuar me mesataren kuadratike dhe korelacionet pjesore ndërmjet trajtimeve hormonale dhe varieteteve të hardhisë. Vrehet kurba lineare në ngjitje për $R^2 = 0.017$ për AIB, $R^2 = 0.463$ për AIA, ndërsa kontrolli paraqet një kurbe lineare me horizontale, qe do të thote aftësi minimale rrënjëzimi. Rezultate analoge janë fituar dhe për numrin e rrënjëve të formuara, të cilat kanë shkuar në rritje nga Kontrolli në përdorimin e AIB 1 mg l^{-1}



Figura 1. Eksplante fillestare me sythin anësor, që do të inokulohet në terrenin ushqyes

Me rezultatet e dy varieteteve është konfirmuar se sasia e rrënjëve të diferencuara ka qënë nën influencën e fazës së rrënjëzimit dhe fitohormonit.

Numri i rrënjëve për cdo filiz ka rezultuar më i madh në rastet e përdorimit të tretësirave hormonale në krahasim me Kontrollin. Kur është përdorur AIB 1 mg l^{-1} , kultivari Vlosh ka formuar mesatarisht 7.6 rrënjë, ndërsa po ky cultivar me përdorimin e auksines tjetër,

AIA 1mg l^{-1} ka formuar mesatarisht 5.3 rrënjë, ndërsa Kontrolli 1.7 rrënjë. Të dhënat e numrit të rrënjëve në llogarinë e cdo kultivari rezultojnë me ndryshime të vërtetuara për lsd 2.41 midis tre trajtimeve, ku efekte më të mira ka patur përdorimi i AIB 1mg l^{-1} . Përdorimi i hormoneve gjithmonë ka dhënë numër më të madh rrënjësh se Kontrolli. Degëzat e zhvilluara nga kulturat e sytheve priten dhe transferohen në terrene rrënjëzimi. Megjithëse në terrenin ku mungon AIB dhe AIA d m th në Kontrollin ndodhin rrënjëzime spontane me frekuencë relativisht të ulët, shtimi i auksinës, vecanërisht në dozën 1mg l^{-1} , ka nxitur rrenjhezimin dhe numrin e rrenjhezimeve per degez ne krahasim me trajtimin pa përdorimin e auksinës. Po ashtu tregohet se AIB është një auksinë më e përshtatshme, ndërsa tipet e tjera si psh AIA ka cuar ne formimin e kallusit dhe ka patur përqindje më të ulët rrënjëzimi .



Figura 2. Stade të ndryshme të rrënjëzimit të filizave të prodhuara “in vitro” të kultivarëve në studim të hardhisë

Terreni MS pa AIB ka vërtetuar rezultate të ulta në formacionin rrënjor, gjithashtu u vërejtën rrënjë me frekuencë të lartë në terren MS me AIB, por niveli i AIB ishte i ndryshëm, gjithmonë më i mirë ndaj AIA. Studimi përshkruan dhe ka vërtetuar një metodë mikroshtimi për dy kultivarët. U konstatua se, si proliferimi i bimëzave, si formimi i kallusit janë kryer në menyrë të përkryer nga përdorimi i BAP dhe AIB/AIA.

PËRFUNDIME

Procedura e mikroshtimit “in vitro” nëpërmjet zhvillimit të sythit prej kulturës sythore ka siguruar avantazhe të rëndësishme për mikroshtimin e shpejtë tek të dy kultivarët e hardhisë.

Koncepti i testimit të hipotezave për dy kultivarët Vlosh dhe Shesh, trajtimet hormonale etj ka predispozuar statistika përshkruese që kanë ndikuar

për të kuptuar dallimet e efekteve të larta të trajtimeve të AIB dhe AIA në mesatare të gjithë vlerave, por dhe devijimi i secilit prej mesatares në kuadrin e performancës individuale.

Rezultatet pozitive të mikroshtimit “in vitro” për dy kultivaret e hardhisë shërbejnë si bazë për përdorimin me sukses të metodave “in vitro” të ruajtjes së resurseve autoktone të hardhisë me anë të rritjes minimale për afat te mesem dhe te kriokonservimit per ruajtje afat-gjate.

Nëpërmjet vazhdimit të protokollit të shumëzimit , aplikimi i dy stimulante sintetik të rrënjëzimit AIB dhe AIA 1mg l^{-1} , ka nxitur përqindje më të lartë rrënjëzimi se në rastin kur nuk është përdorur hormon (Kontrolli). Ndërkohë, përqindja më e lartë e rrënjëzimit është arritur kur është aplikuar AIB, karakterizuar dhe për mesatare më të lartë të numrit të rrënjëve.

Shtimi i përqendrimit të IBAs shtoi përqindjen rrënjëzimit dhe numrin mesatar të rrënjëve/eksplant. IBA, nxiti rrënjë të mira dhe potencial fiziologjik të lartë.

Temperatura më e përshtatshme ka qënë 24 gradë dhe lagështia 85%

Konform eksperiencës së arritur në një cikël vjetor është përlogaritur se mund të realizohen 14 subkultura e tre cikle mikroshtimesh. Dmth 100×314 (Progrosion gjeometrik)

LITERATURA

- 1 Gray D. J. and C. P. Meredith, 1992. Grape biotechnology, *In*: F. A. Hammerschlag and R. E. Litz (Eds.) Biotechnology in Perennial Fruit Crops, CAB International Wallingford U.K., pp. 229-262
- 2 M. E. Compton, 1992. Applications of synthetic seed technology to grape germplasm storage, *In*: K. Redenbaugh (Ed.) SynSeeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press, Boca Raton, pp. 367-379.
- 3 Mortensen, J. A. and D. J. Gray, 1987. ‘Orlando Seedless’ grape, *HortScience* 22, 327-328.
- 4 Compton, M. E. and D. J. Gray, 1996. Effects of sucrose and methylglyoxal Bis- (guanylhydrazine) on controlling grape embryogenesis, *Vitis* 35, 1996, 1-6.
- 5 Jayasankar, S., Z. Li and D. J. Gray, 2000. In vitro selection of *Vitis vinifera* Chardonnay with *Elsinoe ampelina* is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase, *Planta* 211, pp. 200-208.
- 6 Barlass M., Skene K.G.M. (1980) Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. The regenerative capacity of leaf primordial fragments in vitro. *J. Exp. Bot.*
- 7 Chee R., Pool R.M. (1983) In vitro vegetative propagation of *Vitis*: Application of previously defined

- culture conditions to a selection of genotypes. *Vitis* 22: 363-74
- 8 Chee R., Pool R.M., Bucher D. (1984) A method for large scale in vitro propagation of *Vitis*. *New York Food Life Sci. Bul.*
- 9 Grenan S. (1992) Micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.). In: Bajaj Y.P.S. (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, Vol 18. High-Tech and Micropropagation II* (pp. 371-397). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- 10 Harris R.E., Stevenson J.H. (1982) In vitro propagation of *Vitis*. *Vitis*
- 11 Heloir, M.C., Fournioux J.C., Oziol L., Bessis, R. (1997) An improved procedure for the propagation in vitro of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary bud microcuttings *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 49
- 12 Lee N., Wetzstein H.Y. (1990) In vitro propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 324–329
- 13 Mhatre M., Salunkhe C.K., Rao, P.S. (2000) Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: towards an improved protocol. *Sci. Hort.* 84: 357-363
- 14 Monette P.L. (1988) Grapevine (*Vitis vinifera* L.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.6, Crops II*. Bajaj Y.P.S. (ed.). 6: 3–37. Springer Verlag Berlin Heidelberg, Germany
- 15 Morini S, Marzioletti P., and Barbieri C. (1985) In vitro propagation of grapevine. *Riv. Ortoflorofrutt. Ital.* 69: 385-396
- 16 Murashige T., Skoog F. (1962) A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 472-497
- 17 Qiu W., Fekete S., Todd T., Kovács L. (2004) Facilitation of Microshoot Tip Propagation of *Vitis aestivalis* var. Norton by Combined Application of an Antioxidant and Cytokinins. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55: 112-114.
- 18 Thies K.L., Graves C.H. (1992) Meristem micropropagation protocols for *Vitis rotundifolia* *HortScience* 27:447-449
- 19 Zatiko J.M., Molnar I. (1985) Preliminary results on the in vitro mass propagation of grapes from shoot-tip meristem. *Fruit Sci. Rep.* 12:83-85