

Nikolova, V., Dimanov, D. and Gandev, S., 2016. Investigating the possibilities for callus induction from walnut (*Juglans regia*) in vitro. *Rastenievadni nauki (Bulgarian Journal of Crop Science)*, 53(4), pp. 15–19

Проучване на възможността за индуциране на калусна тъкан при обикновен орех (*Juglans regia*) in vitro

Виктория Николова^{1*}, Димитър Диманов², Стефан Гандев¹

¹Институт по овъщарство - Пловдив

²Институт по тютюна и тютюневите изделия - Марково

*e-mail: viki_mkd@abv.bg

Резюме

Проучени са възможностите за индукция на калус от различни растителни експланти при обикновен орех (*Juglans regia*) в in vitro условия. Като източник на растителни експланти са използвани сегменти от листа и стъбла от млади едногодишни растения. Изследвани са три хранителни среди, върху които е индуцирана калусна тъкан. Проучването е извършено в периода май – декември 2016 г. в Производствената лаборатория за in vitro размножаване в Института по овъщарство – Пловдив. Резултатите показват, че при листни сегменти калусна тъкан се индуцира на среда DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) с 1 mg/l BAP и 3 mg/l NAA (АНО), както и на среда K1 (Диманов, 1987) с 2 mg/l BAP и 6 mg/l NAA. При двете среди калусът започва да се оформя след 15-тия ден. Индукцията на калус от стъблени клетки върху среда DKW започва след 17-тия ден.

Ключови думи: орех, индукция на калус, листа, стъбълца, in vitro

Investigating the possibilities for callus induction from walnut (*Juglans regia*) in vitro

Viktoria Nikolova^{1*}, Dimitar Dimanov², Stefan Gandev¹

¹Fruit-growing institute – Plovdiv, Bulgaria

²Tobacco and Tobacco Products institute – Markovo, Bulgaria

*e-mail: viki_mkd@abv.bg

Abstract

The possibilities for callus induction from different plant explants of walnut (*Juglans regia*) in conditions in vitro have been examined. Segments of leaves and stems of young annual plants have been used as a source of plant explants. Three nutrient media have been tested, on which was induced a callus tissue. The study was carried out in the period May – December 2016, in the laboratory for in vitro propagation at the Fruit Growing Institute – Plovdiv. The results show that a callus tissue has been produced in leaf parts on DKW nutrient medium (Driver and Kuniyuki, 1984) with 1 mg/l BAP and 3 mg/l NAA, and K1 nutrient medium (Dimanov, 1987) with 2 mg/l BAP and 6 mg/l NAA. In both media the callus induction in leaf parts started after the 15th day. The callus induction in stem cells started after the 17th day on DKW nutrient medium.

Key words: walnut, callus induction, leaves, stems, in vitro

Семейство Juglans (Орехови) се състои от няколко вида, разпространени в целия свят. Обикновеният орех (*Juglans regia*) е вид от световно значение поради използването му за дърво и плодове (Scaltsoyiannes et al., 1998). Той е и най-известният представител от семейство Орехови, който се среща предимно в умерените зони на САЩ, Западна Южна Америка, Азия, Централна и Южна Европа. Микроразмножаване на орехи е осъществимо чрез култивиране на растителни сегменти и меристеми (Heile-Sudholt et al., 1986; Navatel and Bougain, 1999), въпреки че методът представя нисък процент на пролиферация (Marques and Dias, 1995). Органогенеза при орех е постигната и от семена (Fatima et al., 2006). Получаване на калуси от зряла тъкан е прилагано и при други дървесни видове - ябълка (Caboni et al., 2000), акация (Vengadesan et al., 2000) и др. В зависимост от желаните резултат, важно е да се определи първоначалната тъкан за получаване на калус (Bandyopadhyay et al., 1999). За индуциране на калусогенез са били използвани котиледони (Gómez et al., 2006), ядра (Cardoza and D'Souza, 2002), прашници (Koleva-Gudeva et al., 2007), овули (Sauer and Wilhelm, 2005), листни дръжки и корени (Geneve, 2005), междувъзлия (Chandra and Bhanja, 2002) и листа (Ainsley et al., 2000). Орехът е трудно размножаващ се овощен вид. Това се дължи на високото съдържание на фенолни елементи, чието оксидиране възпрепятства доброто калусообразуване (Gandev, 2013).

Целта на изследването е да се проучат възможностите за индукция на калусогенез от различни растителни експлантите при обикновен орех (*Juglans regia* L.).

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследването е проведено в Производствената лаборатория за *in vitro* размножаване в Института по овощарство – Пловдив, в периода май – декември 2016 г. Пет млади едногодишни растения от обикновен орех са ползвани като източник на растителни експлантите. Взети са сегменти от листа и стъбла от растенията. Експлантите са обеззаразени посредством традиционната методика, която включ-

ва дезинфекциране чрез поставяне в 70% етилов алкохол за 1 min, стерилизация с 5% Ca(ClO)₂ за 5 min (листни сегменти) и за 8 min (стъбълца), последвано от трикратно измиване със стерилна дестилирана вода. Листните експлантите, нарязани на сегменти с големина 1/1 cm и стъбълцата с дължина около 1-1,5 cm са култивирани на агарова среда в петриевите блюда с диаметър 90 mm. Растителният материал е отгледан на тъмно при температура 24±1°C и влажност 75% във фитостатна камера. За намиране на подходяща хранителна среда за индукция на калус от различните растителни тъкани, експлантите са култивирани на три различни хранителни среди с различен състав на отделните компоненти (Таблица 1).

Първата използвана среда е DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) със съдържание на BAP 1 mg/l и NAA 3 mg/l. Средата е разработена за размножаване на орех. Поради високото съдържание на йодни молекули в ореха, тази среда е лишена от KJ, съдържащ се в по-голяма част от основните среди за *in vitro* култивиране.

Средите K и K1 са по Диманов (1987). Те представляват комбинация от няколко основни среди за тъканно култивиране, а именно: макроелементи MS (Murashige and Skoog, 1962) микроелементи (Heller, 1953) и витамини MW (Morel and Wetmore, 1951). Разликата между двете среди е в различната концентрация на фитохормоните BAP и NAA.

Трите среди са със съдържание на агар 5,85 g/l и Ph 5,6. За да се избегне характерната оксидация на тъканните експлантите, към средите K и K1 са добавени малеинова киселина 40 mg/l и лимонена киселина 40 mg/l. Стерилизацията на всички среди е извършена при 121°C за 20 min и налягане 1,2 atm. За всички варианти хранителна среда са използвани по 10 листни експлантите и по 8 експлантите от стъбълца.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от влиянието на хранителната среда върху степента на развитие на калус от листни сегменти и стъбълца са представени в Таблицы 2 и 3.

Формирането на калус при листните експлантите (Таблица 2) е най-добре изразено на сре-

Таблица 1. Химичен състав на различните хранителни среди за индукция на калус
Table 1. Chemical composition of different nutrient media for callus induction

Компоненти / Components	Хранителни среди / Nutrient media		
	DKW	K	K1
Макроелементи/ Macronutrients	DKW	MS	MS
Микроелементи/ Micronutrients	DKW	Heller	Heller
Витамини/ Vitamines	DKW	MW	MW
ВАР mg/l ВАР mg/l	1	1	2
АНО mg/l NAA mg/l	3	3	6
Захароза g/l Saccharose g/l	30	20	20
Агар g/l Agar g/l	5,85	5,85	5,85
Ph	5,6	5,6	5,6

Таблица 2. Формиране на калус на различни хранителни среди от листни сегменти
Table 2. Callus formation on different nutrient medium from leaf segments

Хранителна среда / Nutrient medium	Листни сегменти / Leaf segments	Индуциран калус / Callus induction	Индуциран калус / Callus induction %
DKW	10	8	80
K	10	2	20
K1	10	8	80

Таблица 3. Формиране на калус на различни хранителни среди от стъбълца
Table 3. Callus formation on different nutrient medium from steams

Хранителна среда / Nutrient medium	Стъбълца / Steams	Индуциран калус / Callus induction	Индуциран калус / Callus induction %
DKW	8	7	87,50
K	8	3	37,50
K1	8	3	37,50

да DKW (със съдържание на ВАР 1 mg/l и NAA 3 mg/l), както и на среда K1 (2 mg/l ВАР и 6 mg/l NAA). При двете хранителни среди получени-ят калус е бяло-зеленикав със зърнеста рехавя

структура. Най-слаб резултат е получен на хранителна среда K.

Индукцията на калус от стъблени клетки (Таблица 3) започва след 17-тия ден върху сре-

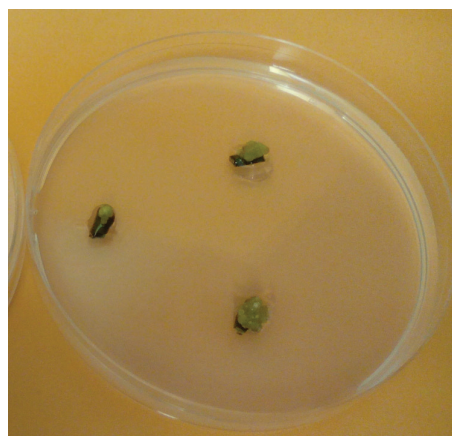
да DKW (1 mg/l BAP и 3 mg/l NAA), при която е получен най-добър резултат във формирането на калусна маса от стъбълца – 87,50% от заложените експланти. При средите K (1 mg/l BAP и 3 mg/l NAA) и K1 (2 mg/l BAP и 6 mg/l NAA) индукцията на калус от стъбълца е 37,50%. Калусът е бяло-зеленикав с рехав зърнеста структура, подходяща за последваща диференциация и регенерация на нови растения.

Средите K и K1 са разработени за индукция на калус при тютюна (Диманов, 1987), но успешно са използвани за индукция на калус и от други видове растения, като пшеница (Dimanov et al., 1994), ориз (Sohou et al., 1994; Dimanov et al., 1994), хризантеми (Диманов и др., 2001), лоза (Ройчев и др., 2002) и др. Двете среди имат различна концентрация на съдържанието на цитокинини и ауксини и еднакъв състав и концентрация на микроелементи, макроелементи и витамини, които в комбинация с растежните регулатори предизвикват недеференцирано делене на клетките.

Получените от нас резултати показват, че тези среди, въпреки че са създадени за *in vitro* експерименти при тютюн, биха могли с успех да се ползват и при други култури, включително орех.

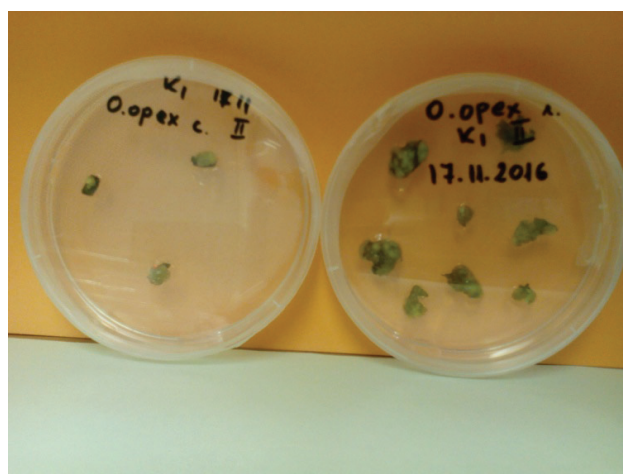
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- За шестмесечен период на изследване върху три хранителни среди е индуцирана калусна тъкан от различни растителни експланти при обикновен орех (*Juglans regia*).
- С цел успешното елиминиране на оксидацията, в хранителните среди K и K1 са добавени органични киселини (малеинова и лимонена), които не позволиха оксидация на тъканните експланти.
- Най-висок процент на калусна индукция е получен на среда DKW (80% при листните сегменти и 87,50% при стъбълцата). Полученият калус от листните и стъблените експланти е със зеленикаво оцветяване и рехав структура, подходяща за последваща регенерация на нови растения.
- На хранителна среда K1 полученият калус от листните сегменти е 80%, а от стъбълцата е 37,50%. Въпреки по-слабия резултат при



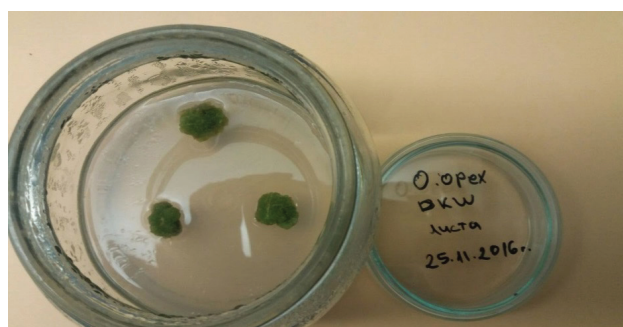
Фигура 1. Оформиен калус на среда K1 от стъбълца

Figure 1. Formed callus on K1 nutrient medium from steams



Фигура 2. Оформиен калус на среда K1 от стъбълца и листни сегменти

Figure 2. Formed callus on K1 nutrient medium from steams and leaf parts



Фигура 3. Оформиен калус на среда DKW от листни сегменти

Figure 3. Formed callus on DKW nutrient medium from leaf parts

стъбълцата, тази среда може успешно да бъде използвана за калусогенеза при орех.

ЛИТЕРАТУРА

- Диманов, Д., 1987. Дисертация. София
- Диманов, Д., Д. Димитрова, К. Върбанова, 2001. Влияние на различен хранителен режим върху микроразмножаване на сортове хризантема. В: Конференция с международно участие “Екологични проблеми на земеделието АГРЕКО”, Научни трудове, АУ, т. XLVI, 1, с. 129-134.
- Ройчев, В., П. Ботянски, С. Янчева, Д. Диманов, 2002. Влияние на хранителната среда и произхода на лозови растения, отглеждани при in vitro условия върху динамиката в нарастването на вегетативните им органи. В: Юбилейна научна сесия с международно участие „100 години Институт по лозарство и винарство, Плевен”, SPS PRINT, София, с. 187-194.
- Ainsley, P., G. Collins and M. Sedgley, 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond, *Prunus dulcis* Mill. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 36, pp. 470-474.
- Bandyopadhyay, S., K. Cane, G. Rasmussen, and J. Hamill, 1999. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*. *Plant Sci.*, 140, pp. 189-198.
- Caboni, E., P. Lauri, and S. D’Angeli, 2000. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Rep.*, 19, pp. 755-760.
- Cardoza, V. and L. D’Souza, 2002. Induction, development and germination of somatic embryos from nucellar tissues of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Sci. Hortic.*, 93, pp. 367-372.
- Chandra, I. and P. Bhanja, 2002. Study of organogenesis in vitro from callus tissue of *Flacurtia jangomonas* (Lour.) Raeush through scanning electron microscopy. *Curr. Sci.*, 83, pp. 476-479.
- Dimanov, D., Petkova, S. and Sohoul, F., 1994. Embryogenic calli induction and plant regeneration in wheat (*Triticum sativum* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) under unified culture conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 8(1), pp. 44-49.
- Driver, J.A. and A.H. Kuniyuki, 1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock [*Juglans hindsii* X *Juglans regia*, tissue culture]. *HortScience (USA)*
- Fatima, A., A.N. Kamili and A.M. Shah, 2006. Plantlet regeneration from excised embryonal axes, shoot apices and nodal segments of *Juglans regia* L. *Acta Hort.* (ISHS), 705, pp. 387-392.
- Gandev, S., 2013. First results of industrial propagation of walnut (*J. regia* L.) in Bulgaria by the hot callus method, using hot water installation. In: IV International Symposium „Agrosym 2013“, pp. 263-267.
- Geneve, R.L., 2005. Comparative adventitious shoot induction in Kentucky coffeetree root and petiole explants treated with thidiazuron and benzylaminopurine. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41(4), pp. 489-493
- Gómez, C., M. Uribe, D. Ríos and M. Sánchez-Olate, 2006. Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. *Interciencia*, 31, pp. 734-738.
- Heile-Sudholt, C., Huettelman, C.A., Preece, J.E., Sambeek, J.W. and Gaffney, G.R., 1986. In vitro embryonic axis and seedling shoot tip culture of *Juglans nigra* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6(2), pp. 189-197.
- Heller, R., 1953. *Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro* (Doctoral dissertation, Masson).
- Koleva-Gudeva, L., M. Spasenoski and F. Trajkova, 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Sci. Hortic.*, 111, pp. 114-119.
- Marques, D. and J. Dias, 1995. In vitro shoot culture on *Juglans regia* L.: repeated subculturing on juvenile and adult material. *Acta Hort.* (ISHS), 442, pp. 251-256.
- Morel, G. and Wetmore R.H., 1951. Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.*, 38, pp. 141-143.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Plant Physiology*, 15, pp. 473-497.
- Navatel, J., and L. Bourrain, 1999. Plant production of walnut *Juglans regia* L. by in vitro multiplication. *Acta Hort.* (ISHS), 544, pp. 465-471.
- Sauer, U., and E. Wilhelm, 2005. Somatic embryogenesis from ovaries, developing ovules and immature zygotic embryos, and improved embryo development of *Castanea sativa*. *Biol. Plant.*, 49, pp.1-6.
- Scaltsyiannes, A., P. Tsoulpha, K.P. Panetsos and D. Moulalis, 1998. Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia*). *Silvae Genetica*, 46, pp. 326-331.
- Sohoul, F., Petkova, S. and Dimanov, D., 1994. Histological analysis of secondary induced embryogenesis in callus culture from mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 8(1), pp. 41-43.
- Vengadesan, G., A. Ganapathi, R. Prem Anand, and V. Ramesh Anbazhagan, 2000. In vitro organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 61, pp. 23-28.