

ВЛИЯНИЕ НА ВИТАМИНИ ВЪРХУ РАСТЕЖА НА *IN VITRO* КУЛТИВИРАНА МАГНОЛИЯ (*Magnolia* sp.)

РОСЕН СОКОЛОВ, БИСТРА АТАНАСОВА, ЕЛЕНА ЯКИМОВА*
Институт по декоративни растения – Негован, София
*E-mail: elena_iakimova@abv.bg

Influence of Vitamins on Growth Performance of *in vitro* Cultured *Magnolia* sp.

R. Sokolov, B. Atanassova, E. Yakimova*
Institute of Ornamental Plants – Negovan, Sofia, Bulgaria

Abstract

The present work was undertaken to elucidate the effect of vitamins and their precursors on the physiological performance of *in vitro* proliferated *Magnolia soulangeana* and *Magnolia grandiflora*. Microplants were grown on Chee and Pool (C2D) Vitis (VM) basal medium supplemented with different concentrations of nicotinic acid, glycine, pyridoxine, thiamine, ascorbic acid and myo-Inositol. The physiological behavior of explants was evaluated by development of axillary shoots and leaves and fresh and dry weights. The effects of combinations of VM with 10 mg/l myo-inositol, 1 mg/l nicotinic acid, 1 mg/l pyridoxine HCl and 1 mg/l thiamine HCl and VM vitamins) and VM supplemented with standard MS vitamins (100 mg/l myo-inositol; 2 mg/l glycine; 0.5 mg/l nicotinic acid; 0.5 mg/l pyridoxine HCl; 0.1 mg/thiamine HCl I) were compared to basal medium lacking vitamins. Besides, nicotinic acid, glycine, pyridoxine HCl and thiamine HCl were applied alone in concentrations of 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l added to VM basal salts. Ascorbic acid was used at 1, 2, 5, 10 and 50 mg/l. Myo-inositol was tested in a range of 10, 50, 100 and 200 mg/l. It was established that the plants growing on medium without vitamins showed statistically similar results to those growing on medium supplemented with vitamin mix MS. The plants cultured on VM supplemented with VM vitamin mix showed improved growth parameters in comparison to those cultured on medium without vitamins or enriched with vitamin mix MS. The strongest positive effect for both studied genotypes was established on VM medium containing 1 mg/l nicotinic acid, 2 mg/l thiamine HCl and 0.1 mg/l glycine. However, the growth response to ascorbic acid differed between the species. For *M. soulangeana* best effect was determined at concentration of 5 mg/l, whereas for *M. grandiflora* 10 mg/l appeared as most appropriate. No significant difference of plantlets growth was observed in dependence on the concentration of pyridoxine HCl, whereas in presence of all tested concentrations of myo-inositol the microplants showed worse characteristics than the ones cultured on medium lacking vitamins. In general, the tested concentrations of vitamins exerted the strongest effect on fresh and dry weight and height of microplants and least affected were the number of axillary shoots and leaves. From this study we conclude that the studied magnolia species differ relatively little in their requirements for the type and concentration of vitamins in the composition of the nutrient medium. However, our results indicate that the standard compositions of MS and VM vitamins are not the optimal for the studied genotypes. The unsatisfactory effect of these compositions on growth and development might be eventually attributed to the relatively high myo-inositol concentration, which was found to reduce the quality of the plants in both species. Our findings demonstrate that for the efficient development of magnolia species under *in vitro* conditions the most important of the tested compounds are nicotinic acid, thiamine, glycine and ascorbic acid.

Key words: Chee and Pool (C2D) Vitis basal salts medium, growth response, magnolia, micropropagation, vitamins

Растенията от семейство Магнолиеви (*Magnoliaceae*), род *Magnolia* L. са цъфтящи широколистни или вечнозелени дървета и храсти, култивирани в райони със субтропически и умерен климат (Figlar and Nooteboom, 2004; Liu, 2004; Callaway, 2010). Соланжовата магнолия (*Magnolia* × *soulangeana*) се култивира в България от първата половина на 20-ти век. В градините и парковете са

застъпени множество нейни сортове и форми. Този вид е устойчив към климатичните условия в страната и е най-често отглежданата магнолия с пролетен цъфтеж. Едроцветната магнолия (*Magnolia grandiflora*) също се култивира отдавна у нас предимно в по-топлите части от страната (по Черноморието и в Южна България). Методите на тъканните култури са подходящ подход за ефективно размножаване

на голямо количество здрав и изравнен посадъчен материал от видовете от род магнолия (Biedermann, 1987; Kamenicka, 1997; Kamenicka and Lanaková, 2000; Paris et al., 2012; Radomir, 2012). Като цяло изследванията обхващат предимно микроразмножаването на соланжовата магнолия (*Magnolia soulangeana*), звездовидната магнолия (*Magnolia stellata*), хибридите от серията *Magnolia* "Little Girls" (*M. liliiflora* × *M. stellata*) и жълтоцъфтящи сортове магнолия (Biedermann, 1987; Tubesing, 1998; Kamenicka and Lanaková, 2000; Callawa, 2010; Paris et al., 2012; Radomir, 2012). Съществена част от проучванията са насочени и върху ин витро култивирането на видове магнолия с фармакологично значение, както и на редки и застрашени генотипове с цел опазването им (Merkle and Wiecko, 1990; Callaway, 2010; Paris et al., 2012).

За инициране на ин витро култури са използвани различни първични експланти (апикални или аксиларни пъпки, стъблени сегменти от млади латорасли и др.). Показано е, че ин витро регенерацията на различните експланти протича с различна ефективност (Biederman, 1987; Kamenicka and Lanaková, 2000; Tubesing, 1998; Paris et al., 2012; Radomir, 2012). Растежът и развитието на тъканните култури от магнолиите зависи от екзогенно приложените РР (РР), като изискванията към вида, концентрацията и съотношението на хормоните варира между етапите на инициране на култура, размножаване и вкореняване и от генотипа (Biederman, 1987; Gabryszewska, 1997; Kamenicka and Valka, 1997; Kamenicka and Lanaková, 2000; Podwyszyńska et al., 2000; Kamenicka and Lanaková, 2001; Tan et al., 2003; Marinesku, 2008; Radomir and Radu, 2008; Paris et al., 2012; Radomir, 2012).

Влиянието на различните витамини и стандартни витаминни комбинации върху развитието на ин витро култури от *Magnolia* са слабо засегнати от досегашните изследвания. Изпитвани са различни основни хранителни среди обогатени със съответните витаминни смеси (Biedermann, 1987; Kamenicka and Lanaková, 2000; Paris et al., 2012), но все още проучванията за установяване ефекта на отделните витамини са много ограничени. Radomir (2012) изпитва стандартните витаминни комбинации – Murashige and Skoog (1962) (MS); Linsmaier and Skoog (1965) (LS), добавени към основна хранителна среда MS, обогатена с различни видове и концентрации на РР, приложени във фазата на инициация на ин витро култура от *M. × soulangeana* и *M. stellata*. И при двата вида като най-подходяща е установена комбинацията на MS с витамини LS (Myo-Inositol 100 mg/l и Thiamine HCl 0,4 mg/l). Същият автор докладва и положителен ефект на аскорбиновата киселина (АсК) в концентрация 5 mg/l във фазата на въвеждане в култура на *M. × soulangeana* и *M. stellata*.

Целта на настоящото изследване беше да се анализира ефектът на 6 витамина и техни метаболитни предшественици върху растежа, развитието и продуктивността на тъканни култури от *Magnolia × soulangeana* 'Alexandrina' и *Magnolia grandiflora*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Началните експланти за въвеждане в ин витро култура от *Magnolia × soulangeana* 'Alexandrina' бяха изолирани от 15-годишно растение, а при *Magnolia grandiflora* – от 30-годишно растение, отглеждани в обществени зелени площи в град Пловдив. За изолитране на първични експланти бяха използвани латерални пъпки от клонки с дължина 15 – 20 cm, събрани през месец февруари. Експлантите бяха стерилизирани с 0,1% разтвор на живачен дихлорид (HgCl₂) с продължителност на експозицията 3 минути и трикратно промиване със стерилна дестилирана вода за по 5 минути. Експлантите бяха въведени в индивидуални епруветки върху хранителна среда MS с витамини и обогатена с 0,25 mg/l BAP. Получените ин витро растения бяха размножавани и поддържани на хранителна среда MS с витамини и добавка на 0,5 mg/l 6-Benzylaminopurine (BAP) и 0,25 mg/l α-Naphthylacetic acid (NAA) – (MS + PP).

За установяване влиянието на основните витамини и техни метаболитни предшественици (миоинозитол, глицин, тиамин, пиридоксин, никотинова и АсК), които са масово използвани в растителните тъкани култури, експлантите от *Magnolia × soulangeana* 'Alexandrina' и *Magnolia grandiflora* бяха прехвърлени върху хранителна среда Chee and Pool (C2D) Vitis Medim (VM), допълнена с 0,5 mg/l BAP и 0,25 mg/l NAA (VM + PP) и съдържаща различни концентрации на всеки един от изпитваните витамини, както и стандартните витаминни смеси MS (Myo-Inositol 100 mg/l, Glycine 2 mg/l, Nicotinic acid 0,5 mg/l, Pyridoxine HCl 0,5 mg/l, Thiamine HCl 0,1 mg/l) и VM (Myo-Inositol 10 mg/l, Nicotinic acid 1 mg/l, Pyridoxine HCl 1 mg/l, Thiamine HCl 1 mg/l). Като контролен вариант беше използвана среда VM без витамини, с добавка на 0,5 mg/l BAP и 0,25 mg/l NAA.

Витамините бяха изпитани при самостоятелно прилагане като добавка към основна хранителна среда VM без витамини, обогатена с 0,5 mg/l BAP и 0,25 mg/l NAA.

Никотиновата киселина беше изпитана в 4 концентрации – 0,1; 0,5; 1 и 2 mg/l; глицинът – в концентрации 0,1; 0,5; 1 и 2 mg/l; пиридоксинът – в концентрации 0,1; 0,5; 1 и 2 mg/l; тиаминът – концентрации 0,1; 0,5; 1 и 2 mg/l; аскорбиновата киселина беше изпитана в 5 концентрации – 1; 2; 5; 10 и 50 mg/l; миоинозитолът беше тестиран в концентрации 10; 50; 100 и 200 mg/l.

На всяка среда бяха заложили по 50 експланта (5 повторения по 10 растения) в 10 буркана (по 5

растения в буркан). За да се елиминира ефектът от предварителното култивиране в среда MS с витамини експлантите бяха култивирани за 30 дни на хранителна среда VM без витамини с добавка на 0,5 mg/l BAP и 0,25 mg/l NAA. Бяха използвани възлови експлантите – с едно междувъзлие, един възел и един лист. Всички експлантите бяха от латерални пъпки. Продължителността на субкултивирането беше 60 дни.

Отчитани са следните показатели на растежа и развитието: свежо тегло, сухо тегло, брой латерални разклонения, брой листа на целия експлант (на всички издънки); максимална височина (височината на най-високата издънка на всеки експлант, като височината е измервана от нивото на хранителната среда до върха на стъблото).

Получените експериментални данни бяха обработени статистически с помощта на софтуерните продукти SPSS (IBM). Статистическата значимост на разликата между различните варианти беше доказана чрез ANOVA и тест за множество сравняване на Дънкан.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Ефект на стандартните витаминни комбинации

Проучваните видове *M. × soulangeana 'Alexandrina'* и *M. grandiflora* показаха сходство по отношение на реакцията им към изпитваните стандартни витаминни смеси (табл. 1). В сравнение със средата без витамини, средите, които бяха обогатени с витамини MS и VM показват различни резултати. Не беше установена статистически значима връзка между съдържанието на двете витамини смеси и сухото тегло на експлантите, както и връзка между тях и средният брой издънки на едно растение.

Най-съществени различия между двата витаминни микса и средата без витамини се наблюдаваха по отношение на свежото тегло на експлантите. Растенията, развиващи се на среда, обогатена с витамини MS имаха по-ниско средно свежо тегло в сравнение с растенията, отгледани върху среда без витамини. Експлантите, отгледани на среда, обогатена с витамини VM имаха по-високо свежо тегло в сравнение с тези на средата без витамини. По отношение на средния брой листа на едно микрорастение и средната височина, растенията, отгледани на среда без витамини и на среда обогатена с витамини MS показваха сходни резултати, докато растенията, развивали се на среда обогатена с витамини VM слабо ги превъзхождаха и по двата признака.

Ефект на мио-инозитола

Ефектът на мио-инозитола, приложен в различни концентрации към хранителната среда до голяма степен е аналогичен и за двата проучвани

вида *M. × soulangeana 'Alexandrina'* и *M. Grandiflora* (табл. 2). Получените данни показаха липса на връзка между съдържанието на мио-инозитол и вариацията в средното сухо тегло на експлантите, броя странични издънки и броя листа. Свежото тегло и при двата проучвани вида намаляваше при високи концентрации на мио-инозитола (100 – 200 mg/l), докато при ниските концентрации (10 – 50 mg/l) свежото тегло не се различаваше от това на растенията, отгледани на хранителна среда без витамини, или слабо го превишава. Най-високо свежо тегло и при двата изследвани вида беше отчетено на среда, съдържаща 10 mg/l мио-инозитол, превъзхождащо това при хранителната среда без витамини за *M. × soulangeana 'Alexandrina'* с 1,35%, а при *M. grandiflora* – с 2,35%. По отношение на височината се наблюдаваше намаляване с увеличаване на концентрацията на мио-инозитол и при двата вида, като най-голяма средна височина беше отчетена при растенията, култивирани върху среда без витамини. При *M. × soulangeana 'Alexandrina'* растенията, култивирани на среда, съдържаща 10 mg/l мио-инозитол показаха подобни резултати с тези върху средата без витамини.

Ефект на никотиновата киселина

Ефектът на никотиновата киселина беше много сходен и при двата проучвани вида *Magnolia* (табл. 3). Получените данни не показаха връзка между концентрацията на никотинова киселина и броя на страничните разклонения. Най-високо свежо тегло и при двата вида беше отчетено при растенията, култивирани на среда, съдържаща 1 mg/l никотинова киселина, превъзхождащо свежото тегло при средата без витамини, съответно с 24% при *M. × soulangeana 'Alexandrina'* и с 26,1% при *M. grandiflora*. Близки резултати бяха получени и при хранителната среда, съдържаща 2 mg/l никотинова киселина. Ефектът на никотиновата киселина върху сухото тегло беше подобен, но значително по-слаб – най-високо сухо тегло беше измерено при концентрация от 1 и 2 mg/l никотинова киселина. Растенията, култивирани на среда, обогатена с 1 mg/l никотинова киселина показаха с 8,1% по-високо сухо тегло в сравнение с тези, култивирани на среда без витамини при *M. × soulangeana 'Alexandrina'* и с 11,16% при *M. grandiflora*. При вариантите, обогатени с 1 и 2 mg/l никотинова киселина беше отчетен и по-висок среден брой листа на едно растение, съответно 19,2% при *Magnolia × soulangeana 'Alexandrina'* и с 20,28% при *Magnolia grandiflora*. Аналогичен беше ефектът на никотиновата киселина върху височината на експлантите. Най-голяма височина имаха растенията, култивирани на среди, обогатени с 1 и 2 mg/l никотинова киселина. При среда, обогатена с 1 mg/l никотинова киселина микрорастенията бяха по-високи от тези,

Таблица 1. Ефект на стандартните витаминни миксове върху развитието на *in vitro* култури от магнолия
Table 1. Effect of standard vitamin compositions on the development of *in vitro* cultures of magnolia

Variants	Fresh weight, mg	Dry weight, mg	Axillary shoots(no.)	Leaf number	Plant height, mm
<i>Magnolia × soulangeana 'Alexandrina'</i>					
Without vitamins	1548 ± 520 ^b	147 ± 45 ^a	4.23 ± 1.65 ^a	16.94 ± 4.67 ^a	41.21 ± 7.43 ^a
Vitamins VM	1688 ± 530 ^c	151 ± 55 ^a	4.21 ± 1.64 ^a	18.36 ± 5.3 ^b	44.32 ± 7.98 ^b
Vitamins MS	1448 ± 460 ^a	145 ± 42 ^a	4.24 ± 1.52 ^a	16.75 ± 4.12 ^a	39.15 ± 5.92 ^a
<i>Magnolia grandiflora</i>					
Without vitamins	1739 ± 552 ^b	154 ± 52 ^a	6.65 ± 1.48 ^a	18.44 ± 4.35 ^a	36.38 ± 5.58 ^a
Vitamins VM	1896 ± 602 ^c	158 ± 48 ^a	6.60 ± 1.88 ^a	20.04 ± 4.08 ^b	39.13 ± 4.9 ^b
Vitamins MS	1627 ± 517 ^a	153 ± 57 ^a	6.67 ± 1.18 ^a	18.23 ± 4.24 ^a	34.56 ± 5.36 ^a

Разликите между стойностите, означени с различни букви са статистически доказани.
The differences between the values marked with different letters are statistically proven.

Таблица 2. Ефект на мио-инозитола върху развитието на *in vitro* култури от магнолия
Table 1. Effect of Myo-Inositol on the development of *in vitro* cultures of magnolia

Variants	Fresh weight, mg	Dry weight, mg	Axillary shoots (no.)	Leaf number	Plant height, mm
<i>Magnolia × soulangeana 'Alexandrina'</i>					
Without vitamins	1548 ± 520 ^c	147 ± 45 ^a	4.23 ± 1.65 ^a	16.94 ± 4.67 ^b	41.21 ± 7.43 ^c
Myo-Inositol 10 mg/l	1569 ± 450 ^d	145 ± 47 ^a	4.27 ± 1.48 ^a	16.91 ± 5.06 ^b	39.89 ± 7.36 ^c
Myo-Inositol 50 mg/l	1513 ± 380 ^c	145 ± 43 ^a	4.28 ± 1.35 ^a	17.21 ± 4.3 ^b	36.29 ± 6.20 ^b
Myo-Inositol 100 mg/l	1417 ± 440 ^b	146 ± 40 ^a	4.31 ± 1.34 ^a	16.83 ± 3.77 ^b	35.81 ± 7.38 ^b
Myo-Inositol 200 mg/l	1336 ± 480 ^a	144 ± 37 ^a	4.25 ± 1.28 ^a	16.48 ± 3.44 ^a	34.06 ± 5.87 ^a
<i>Magnolia grandiflora</i>					
Without vitamins	1739 ± 552 ^b	154 ± 52 ^a	6.65 ± 1.48 ^a	18.44 ± 4.35 ^a	36.38 ± 5.58 ^e
Myo-Inositol 10 mg/l	1780 ± 566 ^c	155 ± 42 ^a	6.71 ± 1.36 ^a	18.41 ± 4.42 ^a	35.22 ± 6.21 ^d
Myo-Inositol 50 mg/l	1752 ± 553 ^c	152 ± 49 ^a	6.73 ± 1.51 ^a	18.73 ± 4.36 ^a	33.69 ± 5.65 ^c
Myo-Inositol 100 mg/l	1661 ± 528 ^a	153 ± 51 ^a	6.78 ± 1.29 ^a	18.32 ± 4.27 ^a	32.41 ± 5.35 ^b
Myo-Inositol 200 mg/l	1605 ± 510 ^a	151 ± 39 ^a	6.69 ± 1.08 ^a	17.94 ± 4.18 ^a	30.72 ± 5.23

Разликите между стойностите, означени с различни букви са статистически доказани.
The differences between the values marked with different letters are statistically proven.

култивирани на среда без витамини, съответно с 10,48% при *Magnolia × soulangeana 'Alexandrina'* и с 9,09% при *Magnolia grandiflora*.

Ефект на тиамина

Най-високо свежо тегло и при двата вида беше отчетено при растенията, отглеждани на среда, обогатена с 2 mg/l тиамин, превъзхождащи тези при среда без витамини, съответно с 28,6% при *M. × soulangeana 'Alexandrina'* и с 31,62% при *M. grandiflora* (табл. 4). На същата среда беше отчетено и най-ви-

соко сухо тегло, превишаващо отчетеното на среда без витамини с 16,32% при *M. × soulangeana 'Alexandrina'* и с 14,93% при *M. grandiflora*. Максимален брой листа се развиха при растенията, отглеждани на среда, обогатена с 2 mg/l тиамин, превъзхождащи по този признак растенията, отглеждани на среда без витамини със 17,18% при *M. × soulangeana 'Alexandrina'* и с 21,53% при *M. grandiflora*. На средата, обогатена с 2 mg/l тиамин беше отчетена и максимална височина, превъзхождаща тази при растенията, култивирани на среда без витамини с 24,89%

Таблица 3. Ефект на никотиновата киселина върху развитието на *in vitro* култури от магнолия
 Table 3. Effect of nicotinic acid on the development of *in vitro* cultures of magnolia

Variants	Fresh weight, mg	Dry weight, mg	Axillary shoots (no.)	Leaf number	Plant height, mm
<i>Magnolia × soulangeana</i> 'Alexandrina'					
Without vitamins	1548 ± 520 ^a	147 ± 45 ^a	4.23 ± 1.65 ^a	16.94 ± 4.67 ^a	41.21 ± 7.43 ^a
Nicotinic acid 0.1 mg/l	1620 ± 520 ^a	145 ± 48 ^a	4.21 ± 1.71 ^a	18.91 ± 5.27 ^b	41.52 ± 7.67 ^a
Nicotinic acid 0.5 mg/l	1741 ± 550 ^b	148 ± 51 ^{ab}	4.22 ± 1.68 ^a	18.75 ± 5.89 ^b	42.28 ± 7.62 ^a
Nicotinic acid 1 mg/l	1921 ± 610 ^c	159 ± 59 ^b	4.24 ± 1.72 ^a	20.20 ± 6.24 ^c	45.53 ± 8.06 ^b
Nicotinic acid 2 mg/l	1915 ± 630 ^c	159 ± 58 ^b	4.21 ± 1.68 ^a	20.12 ± 6.01 ^c	45.84 ± 8.34 ^b
<i>Magnolia grandiflora</i>					
Without vitamins	1739 ± 552 ^a	154 ± 52 ^a	6.65 ± 1.48 ^a	18.44 ± 4.35 ^a	36.38 ± 5.58 ^a
Nicotinic acid 0.1 mg/l	1889 ± 590 ^b	157 ± 56 ^{ab}	6.63 ± 1.38 ^a	20.58 ± 4.56 ^b	36.66 ± 5.73 ^a
Nicotinic acid 0.5 mg/l	1955 ± 621 ^c	162 ± 47 ^{bc}	6.63 ± 1.30 ^a	20.41 ± 4.7 ^b	38.21 ± 4.91 ^b
Nicotinic acid 1 mg/l	2193 ± 697 ^d	172 ± 48 ^c	6.66 ± 1.89 ^a	22.18 ± 5.14 ^c	39.69 ± 5.26 ^c
Nicotinic acid 2 mg/l	2186 ± 485 ^d	173 ± 64 ^c	6.63 ± 1.59 ^a	21.91 ± 5.11 ^c	39.77 ± 6.28 ^c

Разликите между стойностите, означени с различни букви са статистически доказани.
 The differences between the values marked with different letters are statistically proven.

Таблица 4. Ефект на тиамина върху развитието на *in vitro* култури от магнолия
 Table 4. Effect of thiamine on the development of *in vitro* cultures of magnolia

Variants	Fresh weight, mg	Dry weight, mg	Axillary shoots (no.)	Leaf number	Plant height, mm
<i>Magnolia × soulangeana</i> 'Alexandrina'					
Without vitamins	1548 ± 520 ^a	147 ± 45 ^a	4.23 ± 1.65 ^a	16.94 ± 4.67 ^a	41.21 ± 7.43 ^a
Thiamine HCl 0.1 mg/l	1661 ± 530 ^b	157 ± 51 ^b	4.25 ± 1.57 ^a	18.58 ± 4.47 ^b	42.15 ± 7.98 ^{ab}
Thiamine HCl 0.5 mg/l	1785 ± 360 ^{bc}	160 ± 54 ^b	4.25 ± 1.45 ^a	18.98 ± 5.11 ^{bc}	44.08 ± 8.95 ^b
Thiamine HCl 1 mg/l	1845 ± 280 ^c	163 ± 57 ^{cd}	4.26 ± 1.29 ^a	19.73 ± 5.55 ^{cd}	46.91 ± 8.63 ^b
Thiamine HCl 2 mg/l	1992 ± 640 ^d	171 ± 62 ^d	4.32 ± 1.35 ^a	19.85 ± 6.08 ^d	51.47 ± 9.57 ^c
<i>Magnolia grandiflora</i>					
Without vitamins	1739 ± 552 ^a	154 ± 52 ^a	6.65 ± 1.48 ^a	18.44 ± 4.35 ^a	36.38 ± 5.58 ^a
Thiamine HCl 0.1 mg/l	1814 ± 526 ^b	155 ± 43 ^a	6.69 ± 1.68 ^a	20.23 ± 4.48 ^b	40.74 ± 4.96 ^b
Thiamine HCl 0.5 mg/l	2040 ± 658 ^c	158 ± 57 ^a	6.82 ± 1.57 ^{ab}	20.66 ± 4.78 ^b	41.56 ± 5.64 ^{bc}
Thiamine HCl 1 mg/l	2142 ± 721 ^d	165 ± 49 ^b	6.97 ± 0.96 ^b	21.48 ± 5.18 ^c	42.30 ± 5.49 ^{cd}
Thiamine HCl 2 mg/l	2289 ± 567 ^e	177 ± 58 ^b	6.93 ± 1.46 ^b	22.41 ± 5.34 ^d	43.67 ± 6.65 ^d

Разликите между стойностите, означени с различни букви са статистически доказани.
 The differences between the values marked with different letters are statistically proven.

Таблица 5. Ефект на глицина върху развитието на *in vitro* култури от магнолия
Table 5. Effect of glycine on the development of *in vitro* cultures of magnolia

Variants	Fresh weight, mg	Dry weight, mg	Axillary shoots (no.)	Leaf number	Plant height, mm
<i>Magnolia × soulangeana</i> 'Alexandrina'					
Without vitamins	1548 ± 520 ^a	147 ± 45 ^a	4.23 ± 1.65 ^a	16.94 ± 4.67 ^a	41.21 ± 7.43 ^a
Glycine 0.1 mg/l	1826 ± 470 ^b	173 ± 58 ^b	4.37 ± 1.28 ^a	17.97 ± 5.33 ^b	44.45 ± 7.29 ^b
Glycine 0.5 mg/l	1831 ± 510 ^b	174 ± 59 ^b	4.17 ± 1.34 ^a	17.18 ± 5.57 ^a	43.87 ± 7.64 ^b
Glycine 1 mg/l	1823 ± 490 ^b	173 ± 60 ^b	4.33 ± 1.44 ^a	17.08 ± 5.78 ^a	43.72 ± 7.98 ^b
Glycine 2 mg/l	1810 ± 430 ^b	172 ± 54 ^b	4.23 ± 1.38 ^a	16.91 ± 4.68 ^a	43.67 ± 6.31 ^b
<i>Magnolia grandiflora</i>					
Without vitamins	1739 ± 552 ^a	154 ± 52 ^a	6.65 ± 1.48 ^a	18.44 ± 4.35 ^a	36.38 ± 5.58 ^a
Glycine 0.1 mg/l	2120 ± 674 ^c	170 ± 52 ^b	6.88 ± 1.76 ^a	19.36 ± 5.04 ^c	39.24 ± 5.15 ^c
Glycine 0.5 mg/l	2074 ± 563 ^b	167 ± 51 ^b	6.55 ± 1.53 ^a	18.70 ± 4.82 ^b	38.73 ± 4.43 ^b
Glycine 1 mg/l	2065 ± 626 ^b	168 ± 60 ^b	6.81 ± 1.43 ^a	18.60 ± 4.94 ^b	38.60 ± 4.75 ^b
Glycine 2 mg/l	2033 ± 744 ^b	170 ± 58 ^b	6.65 ± 1.76 ^a	18.41 ± 4.64 ^b	38.55 ± 5.02 ^b

Разликите между стойностите, означени с различни букви са статистически доказани.
The differences between the values marked with different letters are statistically proven.

Таблица 6. Ефект на пиридоксина върху развитието на *in vitro* култури от магнолия
Table 6. Effect of pyridoxine on the development of *in vitro* cultures of magnolia

Variants	Fresh weight, mg	Dry weight, mg	Axillary shoots (no.)	Leaf number	Plant height, mm
<i>Magnolia × soulangeana</i> 'Alexandrina'					
Without vitamins	1548 ± 520 ^a	147 ± 45 ^a	4.23 ± 1.65 ^a	16.94 ± 4.67 ^a	41.21 ± 7.43 ^a
Pyridoxine HCl 0.1 mg/l	1568 ± 470 ^a	149 ± 45 ^a	4.22 ± 1.61 ^a	17.06 ± 4.67 ^{ab}	41.61 ± 6.77 ^a
Pyridoxine HCl 0.5 mg/l	1528 ± 520 ^a	145 ± 44 ^a	4.18 ± 1.48 ^a	16.89 ± 4.48 ^a	41.20 ± 6.48 ^a
Pyridoxine HCl 1 mg/l	1545 ± 430 ^a	146 ± 46 ^a	4.21 ± 1.55 ^a	16.93 ± 4.87 ^a	40.98 ± 7.07 ^a
Pyridoxine HCl 2 mg/l	1556 ± 500 ^a	147 ± 44 ^a	4.26 ± 1.48 ^a	17.24 ± 4.59 ^b	41.44 ± 6.48 ^a
<i>Magnolia grandiflora</i>					
Without vitamins	1739 ± 552 ^a	154 ± 52 ^a	6.65 ± 1.48 ^a	18.44 ± 4.35 ^a	36.38 ± 5.58 ^a
Pyridoxine HCl 0.1 mg/l	1727 ± 548 ^a	156 ± 50 ^a	6.65 ± 1.45 ^a	18.57 ± 4.37 ^a	36.74 ± 5.11 ^a
Pyridoxine HCl 0.5 mg/l	1751 ± 465 ^a	155 ± 44 ^a	6.57 ± 1.38 ^a	18.38 ± 4.36 ^a	36.37 ± 5.08 ^a
Pyridoxine HCl 1 mg/l	1735 ± 551 ^a	154 ± 48 ^a	6.63 ± 1.18 ^a	18.43 ± 4.34 ^a	36.18 ± 4.95 ^a
Pyridoxine HCl 2 mg/l	1765 ± 516 ^a	157 ± 43 ^a	6.71 ± 0.93 ^a	18.77 ± 4.42 ^a	36.59 ± 5.25 ^a

Разликите между стойностите, означени с различни букви са статистически доказани.
The differences between the values marked with different letters are statistically proven.

при *M. × soulangeana* 'Alexandrina' и с 20,03% при *M. grandiflora*. При *M. × soulangeana* 'Alexandrina' не беше отчетен ефект на тиамина върху броя на латералните разклонения, но при *M. grandiflora* беше установено повишаване на броя на разклоненията с

4,21% върху среда, обогатена с 2 mg/l тиамин в сравнение със средата без витамини.

Ефект на глицина

Свежото тегло не се повлияваше съществено от

Таблица 7. Ефект на аскорбиновата киселина върху развитието на *in vitro* култури от магнолия
 Table 7. Effect of ascorbic acid on the development of *in vitro* cultures of magnolia

Variants	Fresh weight, mg	Dry weight, mg	Axillary shoots (no.)	Leaf number	Plant height, mm
<i>Magnolia × soulangeana</i> 'Alexandrina'					
Without vitamins	1548 ± 520 ^a	147 ± 45 ^a	4.23 ± 1.65 ^c	16.94 ± 4.67 ^a	41.21 ± 7.43 ^a
Ascorbic acid 1 mg/l	1643 ± 480 ^b	149 ± 61 ^a	4.14 ± 1.52 ^b	17.04 ± 5.85 ^a	46.63 ± 7.32 ^b
Ascorbic acid 2 mg/l	1776 ± 380 ^c	155 ± 54 ^{ab}	4.09 ± 1.38 ^{ab}	18.55 ± 5.32 ^b	49.23 ± 6.95 ^c
Ascorbic acid 5 mg/l	1900 ± 410 ^d	174 ± 62 ^c	4.01 ± 1.73 ^a	19.28 ± 6.25 ^c	53.26 ± 7.56 ^d
Ascorbic acid 10 mg/l	1888 ± 460 ^{cd}	174 ± 64 ^c	3.99 ± 1.86 ^a	19.35 ± 6.31 ^c	53.07 ± 8.09 ^d
Ascorbic acid 50 mg/l	1801 ± 390 ^{cd}	161 ± 56 ^b	3.92 ± 1.88 ^a	18.72 ± 5.43 ^{bc}	50.65 ± 8.01 ^{cd}
<i>Magnolia grandiflora</i>					
Without vitamins	1739 ± 552 ^a	154 ± 52 ^a	6.65 ± 1.48 ^c	18.44 ± 4.35 ^a	36.38 ± 5.58 ^a
Ascorbic acid 1 mg/l	1922 ± 598 ^b	156 ± 55 ^a	6.56 ± 1.31 ^{bc}	21.31 ± 3.93 ^b	39.77 ± 5.86 ^b
Ascorbic acid 2 mg/l	1995 ± 634 ^{bc}	160 ± 58 ^{ab}	6.44 ± 1.25 ^b	22.37 ± 4.68 ^b	43.47 ± 5.79 ^c
Ascorbic acid 5 mg/l	2099 ± 674 ^c	169 ± 50 ^b	6.31 ± 1.48 ^{ab}	23.16 ± 4.89 ^c	46.03 ± 6.67 ^d
Ascorbic acid 10 mg/l	2225 ± 617 ^d	177 ± 60 ^b	6.29 ± 1.19 ^a	23.24 ± 5.13 ^c	48.49 ± 7.06 ^e
Ascorbic acid 50 mg/l	2232 ± 709 ^d	174 ± 65 ^b	6.17 ± 29 ^a	21.80 ± 5.08 ^b	44.72 ± 6.59 ^c

Разликите между стойностите, означени с различни букви са статистически доказани.
 The differences between the values marked with different letters are statistically proven.

концентрацията на глицина като при всички изпитани концентрации при *M. × soulangeana* 'Alexandrina' баха отчетени сходни резултати, които съществено превишаваха тези, отчетени при растенията, култивирани на среда без витамини (съответно с 19,65% при 0,1 mg/l глицин) (табл. 5). При *M. grandiflora* най-високо свежо тегло беше измерено при растенията, култивирани на среда, обогатена с 0,1 mg/l глицин, като те превъзхождаха с 21,9% тези, култивирани на среда без витамини. Растенията, култивирани при най-ниската концентрация на глицин (0,1 mg/l) превъзхождаха по отношение на сухото тегло тези, култивирани на среда без витамини с 17,68% при *M. × soulangeana* 'Alexandrina' и с 10,38% при *M. grandiflora*. Ефектът на глицина върху средния брой листа на едно растение не беше силно изразен, но въпреки това растенията, култивирани на среда, обогатена с 0,1 mg/l глицин превъзхождаха тези върху среда без витамини с 6,08% при *M. × soulangeana* 'Alexandrina' и с 4,98% при *M. grandiflora*. Подобни са и резултатите, установени при средната височина на растенията. И по този признак най-добри резултати се наблюдаваха при

растенията, култивирани на среда, обогатена с 0,1 mg/l глицин. Те превъзхождаха растенията, отглеждани на среда без витамини съответно със 7,73% при *M. × soulangeana* 'Alexandrina' и със 7,86% при *M. grandiflora*. Не беше установена връзка между съдържанието на глицин и броя на страничните разклонения.

Ефект на пиридоксина

Не беше установена статистически доказана разлика между измерваните показатели и концентрацията на пиридоксина (табл. 6). Единствено при *M. × soulangeana* 'Alexandrina' беше отчетено, че на среда, обогатена с 2 mg/l пиридоксин микрорастенията имат с 1,7% по-голям среден брой листа в сравнение с тези, култивирани на среда без витамини.

Ефект на аскорбиновата киселина

Максимално свежо тегло при *M. × soulangeana* 'Alexandrina' бе отчетено при растенията, култивирани върху среда обогатена с 5 mg/l АскК (табл. 7). То надвишаваше с 22,73% свежото тегло на растенията при средата без витамини. Най-високо сухо

тегло беше измерено при растенията, развиващи се върху среда, обогатена с 5 и 10 mg/l АскК, което беше с 18,36% по-високо от това при среда без витамини. В присъствието на АскК средният брой странични разклонения при *M. × soulangeana* 'Alexandrina' беше по-малък, като най-силно това се прояви при средите, обогатени с 5, 10 и 50 mg/l АскК. Растенията, отгледани на тях развиха с 5,6% по-малко странични разклонения. Аскорбиновата киселина има положителен ефект върху средния брой листа. Най-голям среден брой листа е отчетен при растенията, култивирани на среди, обогатени с 5 и 10 mg/l АскК, което се оказа с 13,8% повече листа в сравнение със среда без витамини. Най-високи растения бяха измерени на среда, обогатена с 5 и 10 mg/l АскК, което превишаваше с 29,24% височината на растенията, култивирани на среда без витамини.

Подобен ефект на АскК беше наблюдаван и при *M. grandiflora* (табл. 7). Най-високо свежо тегло беше отчетено при среди, обогатени с 10 и 50 mg/l АскК, което беше с 27,94% по-високо от това върху среда витамини. Най-високо сухо тегло беше измерено при вариантите, обогатени с 5, 10 и 50 mg/l АскК – превишаващо с 14 – 15% тези, култивирани на среда без витамини. Най-малък брой странични разклонения се развиха при вариантите показали най-високо свежо и сухо тегло, а именно при среди, обогатени с 5, 10 и 50 mg/l АскК. Растенията, култивирани на среда, обогатена с 10 mg/l АскК имаха с 5,41% по-малко странични разклонения в сравнение с растенията, култивирани на среда без витамини. Средният брой листа беше най-висок при растенията, отглеждани на среди, обогатени с 5 и 10 mg/l АскК. Растенията, култивирани на среда, обогатена с 5 mg/l АскК развиха с 25,6% повече листа от тези, култивирани на среда без витамини. Максимална височина беше отчетена при растенията, култивирани на среда, обогатена с 10 mg/l АскК, което е средно с 33,28% повече от височината на растенията, отглеждани на среда без витамини.

Подробното проучване на ефекта на различните витамини и подходящите за тяхното прилагане концентрации е съществено за оптимизирането на хранителните среди за култивиране на магнолия ин витро. От нашето проучване се установи, че най-често прилаганият витаминен микс при микроразмножаване на магнолия, а именно витамините MS (Biederman, 1987; Gabryszewska, 1997; Marinescu et al., 2008; Radomir and Radu, 2008; Paris et al., 2012; Radomir, 2012) не оказват съществен ефект върху развитието на изследваните видове магнолия ин витро.

Интересни са и негативните резултати, установени при при мио-инозитола особено в концентрации от 50, 100 и 200 mg/l, въпреки че този компонент

се счита за задължителен във всички използвани витаминни смеси при култивиране на магнолия (Biederman, 1987; Gabryszewska, 1997; Kamenicka and Valka, 1997; Kamenicka and Lanaková, 2001; Podwyszynska et al., 2000; Kamenicka et al., 2001; Tan et al., 2003; Marinescu, 2008; Radomir and Radu, 2008; Paris et al., 2012; Radomir, 2012).

Впечатление прави установеният от нас положителен ефект на аскорбиновата киселина. Тя не е традиционен компонент на използваните до този момент витаминни смеси за култивиране на магнолия, но показва много добри резултати. Radomir (2012) съобщава за максимален процент на регенерирали експлантите от *M. × soulangeana* и *M. stellata* във фазата на въвеждане върху основна среда MS, обогатена с витамини LS + 5 mg/l АскК, но ефектът на аскорбиновата киселина не е изпитан във фазите на мултипликация и вкореняване.

ИЗВОДИ

От изпитаните две витаминни комбинации VM и MS по-добри резултати по отношение на растежа и развитието на ин витро култивирани растения от двата вида магнолия бяха отчетени при растенията, култивирани на среда VM с витамини VM.

Ефект от мио-инозитола в ниски концентрации не беше установен, докато при високи концентрации той оказва неблагоприятно влияние, изразяващо се в по-ниско свежо тегло и по-малка височина на микрорастенията.

Никотиновата киселина показва комплексен положителен ефект, като стимулиране не се наблюдаваше единствено при броя на страничните разклонения.

Тиаминът също показва комплексен положителен ефект върху развитието на проучваните генотипове магнолия при условия ин витро. Той се изразява в повишаване на свежото и сухо тегло, образуване на повече листа на един експлант и по-голяма средна височина на растенията, а при *M. grandiflora* и до слабо повишаване на броя на страничните разклонения.

Глицинът показва положителен ефект спрямо повечето измервани показатели, като този ефект не зависи съществено от приложените концентрации.

Пиридоксинът не показва измерим ефект, различаващ се с контролната среда без витамини.

Аскорбиновата киселина стимулира образуването на повече свежо и сухо тегло при микрорастенията и от двата вида магнолии, както и образуване на по-голям брой листа и по-голяма средна височината на експлантите. Беше установено, че тя оказва неблагоприятен ефект върху броя на страничните разклонения.

Като цяло резултатите от настоящото проучване добавят нова информация за ефекта на отделните витамини и техни комбинации върху растежа и раз-

витието на тъканни култури от изпитваните видове магнолия и са предпоставка за по-нататъшни проучвания в тази сфера.

ЛИТЕРАТУРА

- Biedermann, I. E. G.** 1987. Factors affecting establishment and development of *Magnolia* hybrids in vitro. *Acta Horticulturae*, 212, 625-629
- Callaway, D. J.** 2010. The world of *Magnolias*. Timber Press Incorporated, Portland, Oregon.
- Chee, R., Pool, R. M.** 1987. Improved inorganic media constituents for in vitro shoot multiplication of *Vitis vinifera*. *Scientia Horticulturae*, 32, 85-95
- Figlar, R. B., Nooteboom, H. P.** 2004. Notes on Magnoliaceae. IV. *Blumea*, 49, 1-14
- Gabryszewska, E.** 1997. The influence of cytokinins and thidiazuron on the growth and development of *Magnolia x soulangeana* 'Alexandrina' in vitro. In: Dubert, F., Skoczowski, A. (Eds.). *Zastosowanie Kultur In Vitro w Fizjologii Roślin*. PAN, Kraków, 79-82
- JunLi, L., Mingdong, M.** 2007. Study on browning of endangered *Manglietiastrum (Magnolia) sinicum* in tissue culture. *Journal of Zhejiang University for Science and Technology*, 20-23
- Kamenická, A.** 1998. Influence of selected carbohydrates on rhizogenesis of shoots saucer *Magnolia* in vitro. *Acta Physiologia Plantarum*, 20, 425-429
- Kamenická, A., Lanaková, M.** 2000. Effect of medium composition and type of vessel closure on axillary shoot production of *Magnolia* in vitro. *Acta Physiologia Plantarum*, 22, 129-134
- Kamenická, A., Valka, J.** 1997. Cultivation and propagation of *Magnolias*. Technical University Publishers, Zvolen, Slovakia, 42-82
- Kamenická, A., Kormut'ák, A., Lanaková, M.** 2001. Establishing micropropagation conditions for three *magnolia* species. *Propagation of Ornamental Plants*, 1, 41-45
- Linsmaier, E. M., Skoog, F.** 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18, 100-127
- Liu, Y. H.** 2004. *Magnolia* of China. Beijing Science & Technology Press, Beijing, China
- Marinescu, L., Radomir, A. M., Radu, T., Teodorescu, A., Fleancu, M., Popescu, C.** 2008. Preliminary results regarding the influence of cytokinin on the micropropagation of *Magnolia soulangiana* Soul. *Bot. Bul. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Seria B(51)*, 601-607
- Merkle, S. A., Wiecko A. T.** 1990. Somatic embryogenesis in three *Magnolia* species. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 115, 858-860
- Murashige, T., Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497
- Parris, J. K., Touchell, D. H., Ranney, T. G., Adelberg, J.** 2012. In vitro growth and ex vitro establishment of *Magnolia* 'Ann'. *HortScience*, 47, 1625-1629
- Podwyszyńska, M., Wojtania, A., Gabryszewska, E.** 2000. Application of m-topolin for plant micropropagation. *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach*, 7, 173-180
- Radomir, A.-M.** 2012. Comparative study on the in vitro multiplication potential of *Magnolia stellata* and *Magnolia x soulangiana* species. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16, 39-44
- Radomir, A. M., Radu, C. M.** 2008. Research on behavior of *Magnolia soulangeana* in the multiplication stage of 'in vitro' culture. *Ornamental Plant & Landscape Architecture*, 60, 258-261
- Tan, Z., Hong, Y., Hu, C.** 2003. In vitro culture of *Magnolia grandiflora*. *J. of Hunan Agricultural University*, 29, 478-480
- Tubesing, Ch. E.** 1998. *Magnolias with a future: Propagation and nursery culture*. In: Hunt, D. (ed.) *Magnolias and their allies*. International Dendrology Society, Milborne Port, 193-200
- Valova, M., Krajcova, D., Kamenická, A.** 1996. Changes of mineral elements in explant of *Magnolia x Soulangeana* Soul. – *Bod.* during the culturing in vitro. *Folia Dendrologica*, 21-22, 337-341