

ОПТИМИЗИРАНЕ ПРОЦЕСА НА ВКОРЕНЯВАНЕ ПРИ *IN VITRO* РАЗМНОЖАВАНЕ НА ЧЕРЕШОВАТА ПОДЛОЖКА GISELA 6 (*P. cerasus* × *P. canescens* sp.)

КРЪСТИНА КОРНОВА*, СТАМЕН ПОПОВ
Институт по овощарство, Пловдив
*E-mail: krasikor@abv.bg

Optimizing the Rooting Process in Propagation *in vitro* of Cherry Rootstock Gisela 6

K. Kornova*, S. Popov
Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria

Abstract

The possibilities of optimizing the technological cycle during the micropropagation of Cherry rootstock "Gisela" 6 (*P. cerasus* "Schattenmorele" × *P. canescens* sp.) in the step of rooting *in vitro* were studied. The investigation was carried out in two directions: 1) Following up the effect of the mineral content in the nutrient medium – MS with ¼ macrolelements and its modifications concerning the amount of ammonium nitrate; 2) Study on the effect of auxins – IBA, IAA and NAA at concentration 1.0 mg/l with adding small quantities of GA₃. The best conditions for rhizogenesis provide the medium MS, supplemented with IBA (81.5 – 96.3% rooting), achieving optimal performance regarding of mean number and length of formed roots and stem height. When planting rooted plants in *ex vitro* conditions, a very good transplantation and adaptation was established with active growth of stem segments and leaf mass.

Key words: cherry rootstock, Gisela 6, propagation *in vitro*, rooting, auxins

Във връзка с необходимостта от интензификация в плодотрошването, както при всички овощни култури, така и при черешата се търсят подложки с по-малка сила на растеж, даващи от една страна възможност за засаждане на по-голям брой дървета в декар и от друга – формиране на по-малки корони, позволяващи лесно прибиране на плодовата продукция. Много добър пример в това отношение е черешовата подложка Gisela 6, представляваща хибрид между *P. cerasus* "Schattenmorele" и *P. canescens* sp. Тя не е взискателна към почви, дърветата, присадени върху нея встъпват по-рано в плододаване, не образува издънки, има висока студоустойчивост и много добра съвместимост с черешовите и вишневи сортове. Тези й качества я правят търсена от производителите, което налага бърз отговор на пазарните потребности.

Методът, позволяващ за кратко време и в големи количества да се произведе висококачествен, автентичен посадъчен материал е

размножаването *in vitro*. Изследванията с черешовата и вишнева култури намират приложение още от 90-те години на миналия век (Lioba and Feucht, 1986; Rosati et al., 1992; Schmidt and Ketzler, 1996; Özzambak and Hepaksoy, 1997). Проучванията с черешата касаят, както факторите, осигуряващи добър мултипликационен ефект (Корнова, 2008), така и особеностите в анатомичен аспект на растителните органи (Kitin et al., 2005). Изследванията обаче с по-новите черешови подложки като Inmil GM 9, Camil GM 79, Gisela 5 и Gisela 6 са по-ограничени. Ruzic et al. (2006) при изследване влиянието на минералното хранене установяват при Gisela 5 много добър растеж и развитие на микрорастенията при удвоен състав на N, K, Ca и Mg в среда MS, докато при Camil GM 79 също е установено добро развитие при наличие на N в удвоена MS среда, но P, K, Ca и Mg са по-добре усвоими при отглеждане в основна MS среда. Nacheva and

Gercheva (2009) при микроразмножаване на Gisela 5 установяват най-висока мултипликационна норма при участие на два вида въглехидрати – захароза и сорбитал в съотношение 2: 1 (20 g/l/10 g/l) с добавяне на 0,005 µM IBA. По отношение на коренообразуването *in vitro* същите автори съобщават за Gisela 5 и Gisela 6 много добри резултати при отглеждане в среда ½ MS, с 0,2 mg/l IBA (Nacheva and Gercheva, 2006; 2008).

Основната цел на проведеното изследване касае оптимизиране на параметрите при вкореняване *in vitro* на черешовата подложка Gisela 6 и по-специално установяване влиянието на минералния състав в хранителната среда в комбинация с ауксините IBA, IAA и NAA. Постигането на висок процент вкореняване с необходимия жизнен статус на микрорастенията по отношение на брой, дължина на коренчетата и стъблена височина е предпоставка за успешно адаптиране към условия *in vivo* и доотглеждане за търговска реализация.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването е проведено през периода 2011 – 2013 г. в производствената лаборатория за *in vitro* размножаване на посадъчен материал към Института по овощарство – Пловдив. В процеса на експериментална дейност е установен протокол за въвеждане на експлантите в стерилни условия и мултипликация на черешовата подложка Gisela 6 (*P. cerasuas* "Schattenmorele" × *P. canescens* sp.). С цел оптимизиране на технологичния процес в етапа на вкореняване са проведени изследвания в две направления (табл. 1). Първото касае минералния състав на хранителната среда и по-специално количеството на макроелементите. Проучвани са две хранителни среди, като първата (**A**) е модифицирана MS среда (Murashige and Scoog, 1962) с намалено съдържание на NH₄NO₃ и включване на Ca(NO₃)₂, а втората (**B**) е базова MS среда. И в двете среди количеството на макроелементите е ¼. Второто направление в изследването е насочено към проучване влиянието върху ризогенния процес на три ауксина – Indole-3-butyric acid (IBA), Indole-3-acetic acid (IAA) и α-Naphthalene acetic acid (NAA), в концентрации 1,0 mg/l, както и комбинация между IBA и NAA в малки дози (V6) и IBA с GA₃ (V7). Отчитани са показателите: процент вкоренени

микрорастения, среден брой формирани коренчета, средна дължина на коренче (mm) и средна стъблена височина (mm). Математическата обработка на резултатите е проведена чрез метода ANOVA.

Отглеждането на микрорастенията е извършвано в растежна камера при температура 24 °C интензивност на осветление 3000 lux, поддържано от луминисцентни лампи тип Osram, с бяла, студена светлина и фотопериод 16/8 часа – ден/нощ.

Адаптирането на размножените и вкоренени микрорастения към *ex vitro* условия е извършвано в стоманено-стъклена оранжерия. Растенията са засаджани във форми, запълнени с торфено-перлитна смес и са отглеждани върху стелажи, покрити с полиетиленово фолио. След този етап, прихванатите и адаптирани растения са доотглеждани при полски условия и съответно реализирани.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изследванията в процеса на вкореняване показват специфично влияние върху ризогенните процеси, както на участващите ауксини, така и на състава и количеството на макроелементите в хранителната среда. При участие на **IBA** в хранителната среда по-висок процент вкореняване (92,7%) е постигнат при отглеждане на микрорастенията в модифицираната хранителна среда с намалено съдържание на амониев нитрат (V1) в сравнение с отглеждане в среда B (V2) – фиг. 1. И при двата варианта микрорастенията са с много добър жизнен статус, с развитие на големи, свежи, зелени листа и добре развит апикален връх. Кореновата система е във вид на звезда с 6,3 – 7,3 среден брой коренчета (фиг. 2-V1, V2). По отношение обаче на средната дължина на формираните коренчета тя е с по-високи стойности при растенията, отглеждани в среда B – 33,3 mm сре-

Таблица 1. Схемата на опитната постановка
Table 1. Scheme of the experimental situation

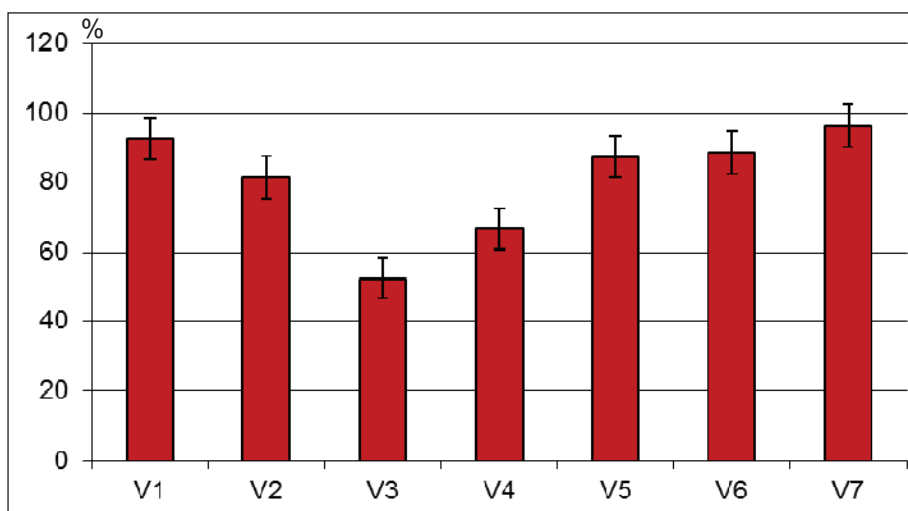
Plant hormones, mg/l	Macroelements – 1/4	
	Medium A	Medium B
IBA – 1.0	V1	V2
IAA – 1.0	V3	V4
NAA – 1.0	V5	
IBA – 0.7 + NAA – 0.3	V6	
IBA – 1.0 + GA ₃ – 0.5		V7

щу 27,5 mm при отглежданите в среда А (фиг. 3-V1, V2). Същата тенденция се запазва и по отношение на средната стъблена височина – 23,6 mm при растенията, отглеждани в среда В срещу 12,5 mm при тези в среда А (фиг. 4).

Позиционирането на микрорастенията в хранителни среди с наличие на **IAA** (V3, V4) доведе до големи различия в тяхното развитие. Постигнат бе сравнително нисък процент на вкореняване макар и с известен превес при отглеждане в среда В – 66,7% (фиг. 1-V4). Хабитусът на растенията бе рязко променен с

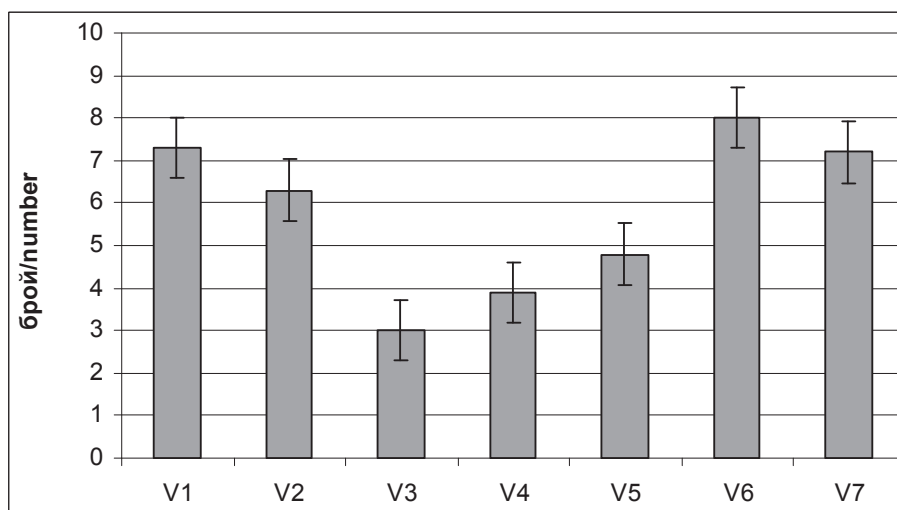
формиране на малка коренова система (3,0 – 3,9 бр. коренчета) (фиг. 2-V3, V4), с къса стъблена част (17,5 – 17,2 mm) (фиг. 4-V3, V4), гарнирана с малки, дребни листа. По-малкият брой коренчета рефлектира в по-голяма средна дължина особено при растенията, отглеждани в среда А 38,3 mm (фиг. 3-V3).

Поставянето на растенията в среда с участие на **NAA (V5)** индуцира сравнително висок процент на вкореняване – 87,5% (фиг. 1), но с лош жизнен статус на микрорастенията. Формираните коренчета са малко на брой – 4,8



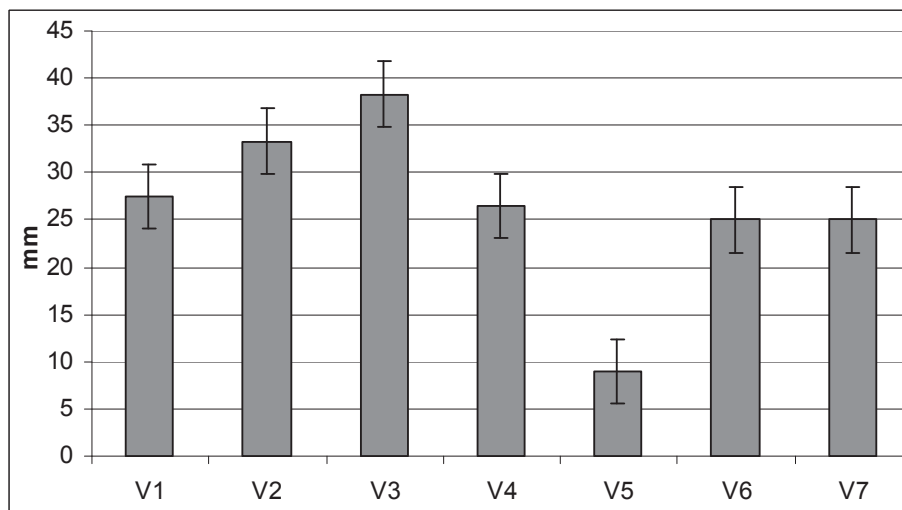
Фиг. 1. Процент на вкореняване при микроразмножени растения от Gisela 6 в хранителни среди с участие на IBA, IAA и NAA. Баровете показват стандартната грешка

Fig. 1. Rooting percentaget of Gisela 6 microplants in a nutrient medium supplemented with IBA, IAA and NAA. The bars indicate the standard error



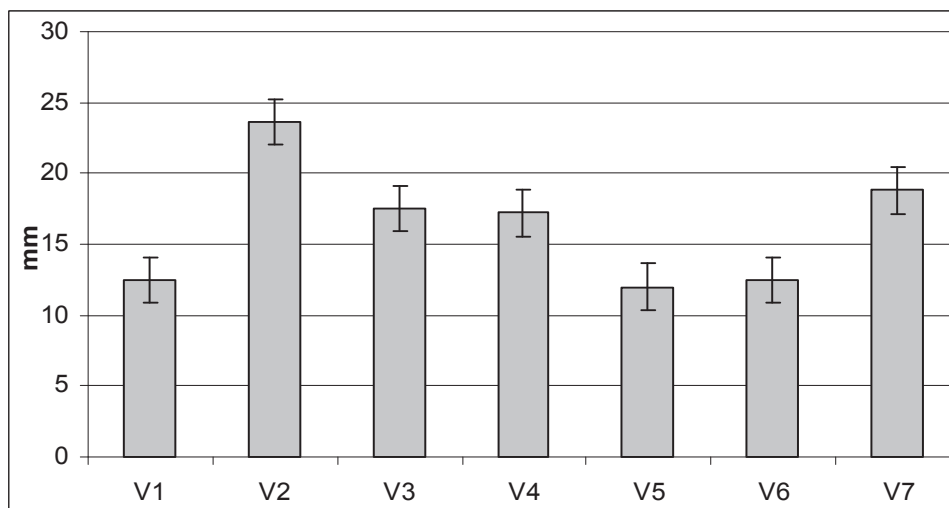
Фиг. 2. Среден брой корени при отглеждане на микрорастенията в изпитваните варианти хранителни среди. Баровете показват стандартната грешка

Fig. 2. Mean number of roots of the plants cultivated in the experimental nutrient medium. The bars indicate the standard error



Фиг. 3. Средна дължина на корен (mm) при отглеждане на микрорастенията в изпитваните варианти хранителни среди. Баровете показват стандартната грешка

Fig. 3. Mean length (mm) of roots of the plants cultivated in the experimental nutrient medium. The bars indicate the standard error



Фиг. 4. Средна височина на стъблената част при вкоренени микрорастения от Gisela 6, отглеждани в изпитваните варианти хранителни среди. Баровете показват стандартната грешка

Fig. 4. Mean stem height of the rooted Gisela 6 microplants, cultivated in the experimental nutrient medium. The bars indicate the standard error

(фиг. 2-V5), с най-малка средна дължина на коренче от всички варианти – 9 mm (фиг. 3-V5). Всичко това рефлектира и в най-малката стъблена височина – 12 mm (фиг. 4) с развитие на малки и дребни листа.

Комбинацията между наличие на 1 mg/l IBA с 0,3 mg/l NAA (**V6**) не промени съществено процеса на ризогенез в сравнение с V5, където участва само NAA. Постигнат бе сравнително висок процент коренообразуване – 88,6% (фиг. 1-V6) с формиране на брадеста коренова система със средно 8 броя коренчета, с

немалка коренова дължина – 25 mm (фиг. 3). Стъблената височина е както при участие на 1 mg/l NAA – 12,5 mm (фиг. 4), с развитие на свежи, но малки листа.

Най-добри резултати са установени при отглеждане на микрорастенията в среда с участие на 1,0 mg/l IBA и добавяне на малки количества GA₃ (**V7**) с минерален състав MS (среда В). Постигнат е отличен резултат относно вкоренителните процеси – 96,3% коренообразуване (фиг. 1-V7) с оптимален среден брой корени – 7 (фиг. 2) и много добре развита

коренова система – 25 mm средна дължина (фиг. 3). Растенията формират едри, свежи, зелени листа и оптимална стъблена височина – 18,8 mm (фиг. 4-V7).

Вкоренените микрорастения са засаждани за адаптиране към условия *ex vitro* в пролетните месеци април – май. Установен е много добър процент на прихващане и бързо развитие на засадените растения.

ИЗВОДИ

При размножаване *in vitro* на черешовата подложка Gisela 6 основен фактор за индукция на ризогенез е участието на прилагания ауксин. Най-добри резултати са постигнати при използване на **IBA** в концентрация 1,0 mg/l. Растенията са с много добър жизнен статус, формират коренова система във вид на звезда с оптимални стойности по отношение на броя и дължината на корените и стъблената височина.

Прилагането на **IAA** не спомага за добро корнообразуване. Процентът на вкореняване рязко намалява (52,5 – 66,7%), с малък брой корени, намаляване на стъблената височина и формиране на малки листа.

По отношение на хабитуса и жизнения статус на микрорастенията подобни резултати са констатирани и при участие в хранителната среда и на **NAA** с тази разлика, че е постигнат по-висок процент на вкореняване.

Относно влиянието на минералния състав в хранителния състав е установено много добро корнообразуване при отглеждане на микрорастенията в намален състав на макроелементи (1/4), както в хранителна среда

MS, така и в нейна модификация с намалено съдържание на NH_4NO_3 и включване на $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ с превез на резултатите при втората среда (92,7 – 96,3%).

ЛИТЕРАТУРА

Корнова, К., С. Попов, Д. Димитрова. 2008. Проучвания върху *in vitro* размножаване на черешови сортове. Научни трудове на СУБ – Пловдив, т. VII, 302-305

Kitin, P., I. Iliev, A. Scaltsoyiannes, C. Nellas, A. Rubos, R. Funada. 2005. A comparative histological study between normal and fasciated shoots of *Prunus avium* generated *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82 (2), 141-150

Lioba, P. and W. Feucht. 1986. Massenvermehrung von *Prunus Cerasus* and *Prunus avium* *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft*, 50 (6), 268-273

Murashige, T. and E. Scoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497

Nacheva, L. and P. Gercheva. 2006. The effect of auxin type and concentration on *in vitro* rooting of Gisels 5 (Cherry dwarf rootstock). *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, vol. 9, 7, 1309-1316

Nacheva, L. and P. Gercheva. 2008. Micropropagation of rootstock for cherry Gisela 6 (*Prunus cerasus* X *Prunus canescens*). *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, vol. 11, 7, 1569-1581

Nacheva, L. and P. Gercheva. 2009. Micropropagation of Gisels 5 (Cherry dwarf rootstock): The effect of the type and the concentration of the carbohydrates in the nutrient medium. *Acta Hort.*, 825, 261-267

Özzambak, E. and S. Hepaksoy. 1997. Investigations on *in vitro* proliferation of sour cherry cv. Heimanns Rubinweichsel. *Acta Horticulturae*, 447, 155-156

Rosati, P., G. Paoli, G. De-Paoli. 1992. Industrial micropropagation of fruit trees and own-rooted plants in Italy. *Fruit Belge*, 60, 440, 318-328

Ruzic, D. J., V. R. M. Cerovic, L. J. Culafic. 2006. The effect of inheriting factor on mineral nutrition of low vigorous sweet cherry rootstocks. *Acta Horticulturae*, 725, 385-39

Schmidt, H. and A. Ketzel. 1996. *In vitro* culture techniques in sweet cherry breeding. *Acta Hort.*, 410, 111-114