

Оптимизиране на микроразмножаването на клоновата черешова подложка Махма 14

Виктория Николова^{1*}, Димитър Диманов², Ваня Акова¹,
Пламен Иванов¹, Ангел Димитров¹

¹Институт по овщарство, Пловдив

²Институт по тютюна и тютюневите изделия, Марково

*E-mail: viki_mkd@abv.bg

Резюме

Оптимизиран е биотехнологичният процес при микроразмножаване на черешовата подложка Махма 14. Експериментите са извършени в периода 2017-2018 г. в Производствената лаборатория за *in vitro* размножаване при Института по овщарство – Пловдив. Увеличаването на концентрацията на цитокинина ВАР по време на мултипликацията оказва влияние върху степента на пролиферация на растенията. При концентрация 1.0 mg.L⁻¹ ВАР, коефициентът на мултипликация е най-висок (6.87). Висок процент на вкореняване е получен при хранителна среда В с 0.5 и 1.5 mg.L⁻¹ IAA (93.33%). По-нисък процент на вкореняване е получен при хранителна среда В, с концентрация на IBA 0.5 mg.L⁻¹ (86.66 %), но с по-добри останали показатели: дължина на корените, височина на растенията и брой листа. Най-добри резултати при адаптиране са получени във Флоат системата.

Ключови думи: черешова подложка; Махма 14; *in vitro*; микроразмножаване; вкореняване; адаптация

Optimizing micropropagation of clonal cherry rootstock Maxma 14

Viktorija Nikolova^{1*}, Dimitar Dimanov², Vanya Akova¹, Plamen Ivanov¹,
Angel Dimitrov¹

¹Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria

²Tobacco and Tobacco Products Institute, Markovo, Bulgaria

*E-mail: viki_mkd@abv.bg

Abstract

Nikolova, V., Dimanov, D., Akova, V., Ivanov, P., & Dimitrov, A. (2018). Optimizing micropropagation of clonal cherry rootstock Maxma 14. *Rasteniievadni nauki*, 55(6), 45-50 (Bg).

The biotechnology of the process of micropropagation for cherry rootstock Maxma 14 is optimized. The experiments were carried out in 2017-2018, at the laboratory for *in vitro* propagation in Fruit Growing Institute – Plovdiv. Increased concentration of cytokinin BAP in multiplication period has an effect on plant proliferation. When BAP concentration is 1.0 mg.L⁻¹, the multiplication coefficient is highest (6.87). A high rate of rooting is obtained in the nutrient medium B with 0,5 and 1.5 mg.L⁻¹ IAA (93.33%). A lower percentage of rooting is obtained in the nutrient medium B, with IBA concentration 0.5 mg.L⁻¹ (86.66%), but with better other indicators: root length, plant height and number of leaves. The best results in acclimatization are obtained in Float system.

Keywords: cherry rootstock; Maxma 14; *in vitro*; micropropagation; rooting; acclimatization

ВЪВЕДЕНИЕ

Изследванията с черешовата и вишневата култури намират приложение още от 90-те години на миналия век (Lioba and Feucht, 1986; Rosati et al., 1992; Schmidt and Ketznel, 1996; Özzambak and Hepaksoy, 1997). Разработването на производствени системи с висока плътност върху черешовите подложки в момента е област на активно изследване (Robinson et al., 2008; Lang, 2009). Днес земеделските стопани предпочитат подложки с бавен растеж, висока гъстота на засаждане, уеднаквен растителен материал, бързооборотни овощни дървета за бърза възвръщаемост на инвестициите. Растенията, получени чрез семена, са сегрегирани и не получават същите качества като родителското растение. Масабът и бързото размножаване на качествените растения могат да бъдат постигнати чрез биотехнологични техники на клоналното микроразмножаване (Ака-Касаг et al., 2010).

Целта на настоящото изследване е оптимизиране на всички етапи от биотехнологичния процес при клоналното микроразмножаване на подложката Махма 14.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Махма 14 представлява хибрид между Mazzard и Mahaleb (Ma x Ma). Тя се оценява с около 20-25% по-слаб растеж от Mahaleb (между подложките Cold и Gisela 6). Махма 14 е полуджудже, встъпва в плододаване по-рано от Mazzard F12-1 (4-5 години) и има висок индекс на добива (Edin et al., 1996). Съвместима е с повечето вишневи и черешови сортове и е една от водещите подложки, използвани в Европа. Изследването е проведено в Производствената лаборатория за *in vitro* размножаване на Института по овощарство – Пловдив, през 2017-2018 г. Комплексът разполага с Лаборатория за микроразмножаване със съответните помещения и оборудване (помещение за приготвяне на хранителни среди, растежни камери, ламинар-боксова зала), както и стъклено-стоманена оранжерия за адаптация на растенията към нестерилни условия. За разработването на успешен протокол за клонално микроразмножаване на Махма 14 са разгледани етапите на биотехнологичния процес:

1. Въвеждане на експлантите в стерилна култура

За изходен материал са взети връхчета и резници от млади летораста на растенията майки през месеците април и май. Растителните експлантите са дезинфекцирани със 70% спирт за 1 минута, измити са със стерилна дестилирана вода, 5% CaOCl за 8-10 минути и са подложени на трикратно промиване със стерилна дестилирана вода. Растителните експлантите са заложени в епруветки с вместимост 20 ml на безхормонална среда MS₀ (Murashige and Skoog, 1962). Отчитането на заложениите растения е направено на 25-30-ия ден след датата на залагане. След това те са прехвърлени на среди за размножаване и са отглеждани във фитостатна камера при температура 23±1°C, фотопериод 16/8 часа светло/тъмно и интензитет на светлината 3000 лукса. Като въглероден източник се използва захароза 20 g.L⁻¹, агар 5.6 g.L⁻¹ при рН на средата 5.6-5.8. Инструментите, стъкларията и материалите са стерилни. Хранителната среда, на която се залагат растителните експлантите, се автоклавира при 121°C за 20 min и налягане 1.2 atm.

2. Мултипликация

Малките растения, 25-30 дни след първото култивиране, се преместват на нова свежа хранителна среда, съдържаща MS макроелементи, допълнена с 6 g.L⁻¹ агар-агар (Valerus) и 30 g.L⁻¹ захароза. Основният компонент, който определя растежа на растенията на този етап, е концентрацията на използвания цитокинин. Неговото присъствие елиминира апикалното доминиране, като по този начин предизвиква развитието на странични пъпки и започва процеса на пролиферация на новите растения. Използваният растежен регулатор е BAP, в три различни концентрации (0.5; 0.75; 1.0) mg.L⁻¹ и 0.1 mg.L⁻¹ IBA. За контрола са използвани растения, заложени на хранителна среда MS₀ (без включени фитохормони); рН на средата е 5.7±0.2 преди добавяне на агар-агар, захароза и автоклавиране. Растенията са поставени във фитостатна камера при 22-24°C и фотопериод 16/8 светло/тъмно. Използвани са по 30 растения в 3 повторения за вариант.

Варианти: MS₀ = MS без добавени растежни регулатори; MS₁ = MS₀ + 0.5 mg.L⁻¹ BAP; MS₂ = MS₀ + 0.75 mg.L⁻¹ BAP; MS₃ = MS₀ + 1.0 mg.L⁻¹ BAP.

3. Вкореняване

Растенията са вкоренени на хранителна среда В (Dimanov and Atanasov, 1986), съдържаща макроелементи 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962), микроелементи (Heller, 1953) и витамини MW (Morel and Wetmore, 1951). Към средата са добавени растежните регулатори IAA и IBA в три различни комбинации (0.5; 1.0; и 1.5) mg.L⁻¹. За контрола са използвани растения, заложи на хранителна среда В₀.

pH на средата е 5.7±0.2 преди добавяне на 6 g.L⁻¹ агар-агар (Valerus) и 20 g.L⁻¹ захароза и автоклавиране. Растенията са поставени в растежна камера при 22-24°C и фотопериод 16/8 светло/тъмно. Използвани са по 30 растения в 3 повторения за вариант. Отчитането на резултатите е направено на 30-тия ден след залагането на растенията.

Варианти: В₀ = В без добавени растежни регулатори; В₁ = В₀ + 0.5 mg.L⁻¹ IAA; В₂ = В₀ + 1.0 mg.L⁻¹ IAA; В₃ = В₀ + 0.5 mg.L⁻¹ IAA; В₄ = В₀ + 0.5 mg.L⁻¹ IBA; В₅ = В₀ + 1.0 mg.L⁻¹ IBA; В₆ = В₀ + 1.5 mg.L⁻¹ IBA

4. Адаптация

Последният етап от биотехнологичния процес е адаптиране на размножените и вкоренени растения при *ex vitro* условия. Растенията са адаптирани по два начина. Първият е традиционен: засаждане на размножените растения в хартиени форми с торф и перлит (2:1). Форми-

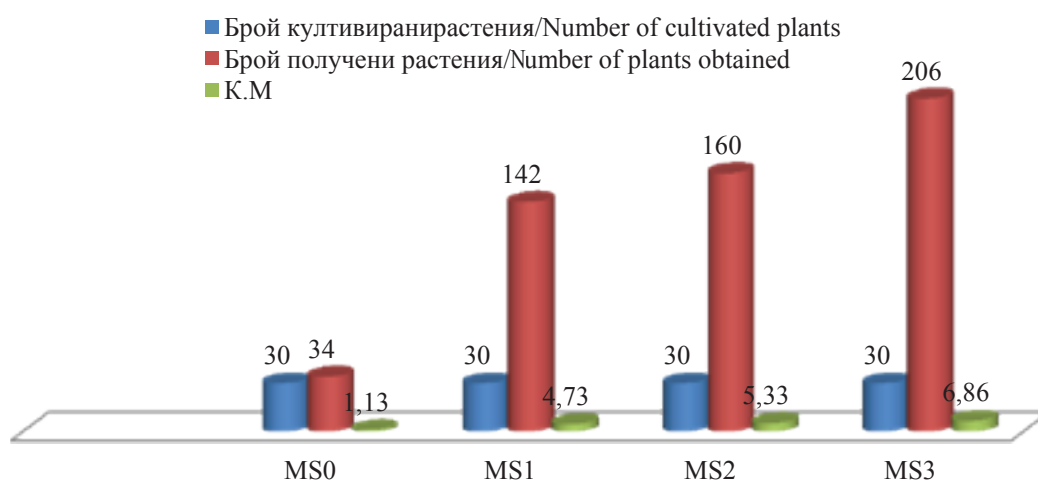
те с растенията се поставят в тунели, покрити с найлон. При втория вид адаптация растенията се засаждат в стиропорни табли с торф и перлит (2:1) и се поставят в тави с воден разтвор на макроелементи и желязо (Флоат система). Адаптацията и по двата метода е направена в стоманена стъклена оранжерия с поддържане на висока влажност. Използвани са 30 растения в 3 повторения за вариант. Отчитането на резултатите е направено на 40-тия ден след засаждането. Използваните хранителни вещества за водния разтвор на Флоат системата са:

NH ₄ NO ₃	1.00 mg.L ⁻¹
KNO ₃	0.25 mg.L ⁻¹
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	0.25 mg.L ⁻¹
MgSO ₄	0.125 mg.L ⁻¹
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0.05 mg.L ⁻¹
FeSO ₄ · 7H ₂ O	36.7 mg.L ⁻¹

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При всички варианти за обеззаразяване на растителния материал се получават около 80% стерилни експланти. Полученият растителен материал е свеж, зелен, жизнен, показващ висока степен на адаптиране към *in vitro* условията.

Резултатите от изследваните варианти в етапа на мултипликация са представени на Фигура 1. Най-висок размножителен коефициент е получен при растенията, култивирани на хра-



Фиг. 1. Влияние на различни концентрации на BAP върху размножителния коефициент (К.М) на черешовата подложка Maxma 14

Fig. 1. Effect of different concentration of BAP on multiplication coefficient (K.M) of cherry rootstock Maxma 14

нителна среда MS₃ с добавен 1.0 mg.L⁻¹ ВАР и 0.1 mg.L⁻¹ ИВА. Някои изследвания показват най-добри резултати при размножаване на експлантите на хранителна среда MS с добавени 0.5 mg.L⁻¹ ВАР, 0.1 mg.L⁻¹ ИВА и 0.1 mg.L⁻¹ GA3 (Buyukdemirci, 2008).

В следващия етап от биотехнологичния процес на клоналното микроразмножаване – вкореняването – растенията, култивирани на различните варианти хранителни среди, дават различен резултат, представен в Таблица 1 и Фигура 2.

Най-висок процент вкоренени растения е получен на хранителната среда В₄ с различните концентрации на IAA. Растенията, заложи на хранителна среда В₄ с 0.5 mg.L⁻¹ ИВА имат висок процент на вкореняване (86.67%). При тази комбинация от минерални соли, витамини и растежни регулатори, високи стойности са получени и за други показатели: средна дължина на корените (30.00 mm), средна височина на растенията (25.50 mm) и среден брой листа на растенията (15.26). Други автори показват по-нисък процент на вкореняване на растенията на хранителна среда MS, с концентрация 9.4 mg.L⁻¹ ИВА (60%), а при по-ниските концентрации на растежния регулатор, този процент е още по-нисък (Canlı and Demir, 2014).

Хранителната среда В₄ използвана в нашия експеримент, първоначално е разработена за

отглеждане на растения *Nicotianum alata* и *N. tabacum* (Dimanov and Atanasov, 1986). По-късно е използвана за вкореняване и на други култури: различни сортове тютюн, картофи, домати (Dimanov et al., 2013), хризантеми (Dimanov et al., 2001a), лозя (Dimanov et al., 2001b). При всичките тези култури хранителната среда е дала високи резултати.

На Фигура 3 са представени резултатите от адаптацията на растенията във външни условия. Обработените статистически данни показват, че няма голяма разлика в двата метода на адаптация на растенията. Всички показатели на растенията, адаптирани във Флоат система са малко по-високи в сравнение с растенията, адаптирани по традиционния начин.

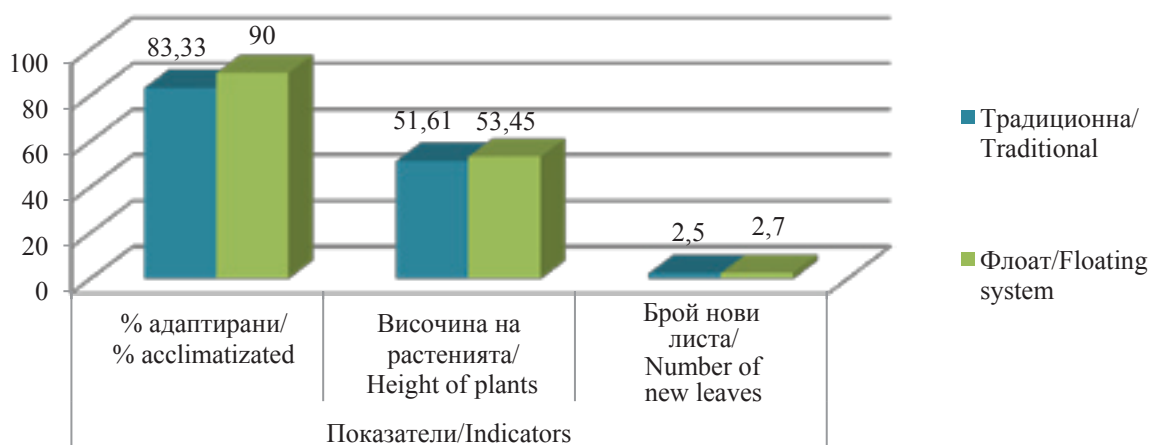


Фиг. 2. Вкоренени растения на хранителна среда В₄
Fig. 2. Rooted plants on В₄ nutrient medium

Таблица 1. Влияние на различни ауксини и техните концентрации в хранителна среда В върху вкореняването на растенията от подложката Махма 14

Table 1. Effect of different auxins and their concentrations in the nutrient medium B on the rooting of plants of Maxma 14 rootstock

Показатели/Indicators					
Хранителна среда/ Nutrient medium	Вкореняване/ Rooting, %	Брой корени/ Number of roots	Дължина на корените/ Length of roots	Височина на растенията/ Height of plants	Брой листа/ Number of leaves
В ₀	10.00 ^d	0.10 ^d	0.20 ^e	22.20 ^{bc}	10.29 ^c
В ₁	93.33 ^a	2.46 ^{ab}	23.17 ^c	22.93 ^b	10.50 ^c
В ₂	93.33 ^a	2.86 ^a	26.70 ^b	20.36 ^d	11.93 ^b
В ₃	93.33 ^a	3.00 ^a	11.65 ^d	21.93 ^c	12.46 ^b
В ₄	86.67 ^a	1.83 ^{bc}	30.20 ^a	25.50 ^a	15.26 ^a
В ₅	53.33 ^b	1.57 ^c	8.66 ^d	21.40 ^c	12.63 ^b
В ₆	36.67 ^c	1.16 ^c	3.80 ^e	22.03 ^c	10.43 ^c



Фиг. 3. Адаптация на растенията

Fig. 3. Acclimatization of plants

По този начин успешно се отглеждат домати (Rideout, 2004). Много водни растения преминават адаптацията си в тази система (Clara et al., 2013).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От досегашната експериментална работа могат да бъдат направени следните изводи:

1. За черешовата подложка Махма 14 най-подходяща по отношение на мултипликацията е хранителната среда MS₃ със съдържание на BAP 1.0 mg.L⁻¹

2. Най-висок процент на вкореняване при подложката Махма 14 се получава на хранителна среда В с растежен регулатор IAA. Резултатът е еднакъв и за трите различни концентрации на IAA.

3. Доказано е, че при подложката Махма 14 най-добри резултати относно всички биометрични показатели са получени на хранителна среда В₄.

4. Адаптацията на вкоренените растения Махма 14 показва предимството на метода Флоат система пред традиционната методика.

ЛИТЕРАТУРА

Aka-Kacar, Y., Akpınar, C., Agar, A., Yalcin-Mendi, Y., Serce, S., & Ortas, I. (2010). The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(3), 5246-5252.

Buyukdemirci, H. (2008). The effects of medium ingredients on shoot propagation and rooting of cherry rootstocks in vitro. In: *Acta Hort.*, 795, V International Cherry Symposium (pp. 419-422).

Canli, F. A., & Demir, F. (2014). In vitro multiplication and rooting of F12-1 (*Prunus avium* L.) and Maxma 14 (*Prunus mahaleb* L. × *P. avium* L.) rootstocks. *Indian Journal of Horticulture*, 71(2), 145-150.

Clara, D., Fira, A., & Joshee, N. (2013). An efficient ex vitro rooting and acclimatization method for horticultural plants using float hydroculture. *Hortscience*, 48(9), 1159-1167.

Dimanov, D., & Atanasov, A. (1986). Development of a regenerative system of mesophilic protoplasmic in *N. tabacum* (Virginia 89) and *N. alata*. *Genetics and Breeding*, 5, 447-449 (Bg).

Dimanov, D., Dimitrova, D., & Varbanova, K. (2001a). Influence of different nutritive regime over micropropagation of chrysanthemum in vitro. In: *Scientific Works of Agricultural University - Plovdiv*, 46(1), 129-134 (Bg).

Dimanov, D., Kirovsky, P., & Roychev, V (2001b). Influence of different nutritive regime on in vitro cultivation of vine. In: *Scientific works of Agricultural University - Plovdiv*, XLVI (5), 251-255 (Bg).

Dimanov, D., Masheva, V., & Dimitrova, D. (2013). Effect of nutritive media on Solanaceae sp. reproduction in vitro. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(1), 139-142.

Edin, M., Garcin, A., Lichou, J., & Jourdain, J. M. (1996). Influence of dwarfing cherry rootstocks on fruit production. In: *Acta Hort.*, 410, II International Cherry Symposium (pp. 239-246).

Heller, R. (1953). Recherches sur la nutrition minerales des tissus vegetaux cultives, in vitro. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, 14, 223.

- Lang, G. A.** (2009). High tunnel tree fruit production: The final frontier?. *HortTechnology*, 19(1), 50-55.
- Lioba, P. & Feucht, W.** (1986). Massenvermehrung von *Prunus cerasus* and *Prunus avium* in vitro. *Gartenbauwissenschaft*, 50(6), 268-273.
- Morel, G., & Wetmore, R. H.** (1951). Fern callus tissue culture. *American Journal of Botany*, 38(2), 141-143.
- Murashige, T., & Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Özzambak, E., & Hepaksoy, S.** (1997). Investigations on in vitro proliferation of sour cherry cv. Heimanns Rubinweichel. *Acta Horticulturae*, 447 (pp. 155-156).
- Rideout, J. W.** (2004). Field growth and yield of tomato transplants grown in the float system using low phosphorus fertilizer and height restricting cultural practices. *HortScience*, 39(1), 23-27.
- Robinson, T. L., Anderson, R. L., & Hoying, S. A.** (2008). Performance of Gisela® rootstocks in six high density sweet cherry training systems in the Northeastern United States. *Acta Hort.*, 795, pp. 245-253.
- Rosati, P., & de Paolli, G.** (1992). Industrial micropropagation of fruit trees and own-rooted plants in Italy. *Fruit Belge*, 60(440), 318-328 (Fr).
- Schmidt, H., & Ketzler, A.** (1996). In vitro culture techniques in sweet cherry breeding. *Acta Hort.*, 410, II *International Cherry Symposium* (pp. 111-114).