

**ФАКТОРИ, ВЛИЯЕЩИ ВЪРХУ ВКОРЕНЯВАНЕТО НА ОВОЩЕН МАТЕРИАЛ, ПРОИЗВЕДЕН ЧРЕЗ СОМАТИЧЕН ОРГАНОГЕНЕЗИС ОТ ЛИСТНИ ЕКСПЛАНТИ**

(Обзор)

**FACTORS AFFECTING THE ROOTING OF FRUIT MATERIAL PRODUCED BY SOMATIC ORGANOGENESIS FROM LEAF EXPLANTS
(Literature review)**

Галя Добревска

Galya Dobrevska

Аграрен университет – Пловдив
Agricultural University – Plovdiv

E-mail: galysd@abv.bg

Резюме

Много важно изискване в производството на овощни дръвчета е чистотата на изходния материал. Това, както и установяването на най-рационална система за *in vitro* размножаване, наложи въвеждането на редица методи за микроразмножаване в овощарството.

Един от тях е соматичният органогенезис. За да бъде успешен този процес, е нужно да се обърне сериозно внимание на вкореняването.

В настоящата работа представяме кратък обзор на световния експериментален опит при вкореняване на растения, получени чрез соматичен органогенезис от листни експланتي.

Abstract

The purity of the starting material is a very important requirement in the production of fruit trees. This and the establishment of the rational system for *in vitro* propagation, have introduced a number of methods for micropropagation in fruit growing.

One is the somatic organogenesis. In order this process to be successful it is necessary to pay serious attention to the rooting.

In this work we present a brief overview of the worldwide experience in experimental rooting of plants obtained through somatic organogenesis from leaf explants.

Ключови думи: овощен материал, вкореняване, соматичен органогенезис, листни експланتي.

Key words: fruit material, rooting, somatic organogenesis, leaf explants.

Използвани съкращения:

NAA – нафтилоцетна киселина;

IBA – индолилмаслена киселина;

BOA – 1,2 – benzisoxazole – 3 – acetic;

2,4-Д – 2,4 – дихлорфеноксицетна киселина;

MS – хранителна среда на Мурашиге и Скуг;

WPM – хранителна среда Woody Plant Medium.

Бързото развитие на фундаменталните науки в края на XX век даде отражение във всички сфери на живота, в т.ч. и в селскостопанската практика.

В съвременното овощарство беше внедрено *in vitro* размножаването като надежден метод за производство на свободен от вируси овощен посадъчен материал. Това направи своеобразен прелом в развитието му.

Микроразмножаването при растенията се основава на уникалната способност на клетката да се регенерира в цялостен организъм. Досега са познати и се експериментират много начини на микроразмножаване. Целта е да се установи най-ефективната система за производство на овощен посадъчен материал. Една от тях, доказала своите предимства, е използването на соматична тъкан от листни експланتي при производството на изходен материал (Dobrevska i Ivanova, 2011).

Значими са предимствата на този метод в овощарството при получаването на някои ябълкови подложки. Dobrevska (2008) разработва успешна технология за производство на ябълковите подложки М9 и ММ106 чрез използване на листни експланتي,

която може да се прилага като моделна система за получаване на посадъчен материал и от други видове, а също - установява добра степен на устойчивост на получените по този начин клонове към *Erwinia amylovora* в лабораторни условия. Затова си струва методът на соматичен органогенезис чрез листни експлант да бъде популяризиран и внедрен в производството на овощен посадъчен материал при ябълката.

Съществена част от този процес при производството на овощни сортове и подложки е вкореняването на получените микрорастения. По този въпрос е експериментирано много малко в световен мащаб, а у нас – не е работено.

Редица са факторите, оказващи влияние върху вкореняването. Някои по-важни от тях са обект на настоящата обзорна работа, в която представяме в хронологичен ред експериментите по този проблем.

Първите опити за вкореняване на растения, получени от соматична тъкан, са били насочени главно към установяване състава на хранителните среди като цяло. Стремешът на авторите е бил да осигурят на експлантите всички необходими за вкореняването им елементи (Murashige and Skoog, 1962; Crow et al., 1971; Curir et al., 1990). По-късно е извършено стриктно анализиране и прецизиране на тези среди и е установено необходимото съотношение между отделните съставки в тях.

Различните клонове подложки и овощни видове имат различни изисквания към хранителните среди за вкореняване, което се явява основна тяхна претенция при протичане на този процес.

Голямо внимание се обръща на ауксините. Това са група фитохормони – както естествени, така и получени по синтетичен път. Те се образуват предимно в растежните върхове на летораслите, в младите листа и в зародишите и по-малко в корените на растенията. Най-важното им физиологично свойство е стимулиране на удължаването и увеличаване на обема на клетките, както и активизиране на клетъчното делене. Ауксините проявяват и т.нар. апикална (връхна) доминантност, т.е. регулират растежа на надземните части и на кореновата система (Mitov et al., 1980). Затова едно от основните им приложения както в клоналното микроразмножаване, така и в соматичния органогенезис е в процеса на вкореняване.

Нафтилоцетната киселина (NAA) принадлежи към групата на ауксините (Mitov et al., 1977; Greene, 2010). Lee et al. (1990) експериментират вкореняване на регенеранти на някои ябълкови подложки, получени чрез соматичен органогенезис, използвайки хранителна среда с базова основа MS - модифицирана с нафтилоцетна киселина (NAA) в няколко концентрации. Най-високи резултати получават при комбинацията модифицирана среда MS и нафтилоцетна киселина (NAA) в концентрация 0,1 mg/l.

Индолилмаслената киселина (IBA) е друг подходящ ауксин, подпомагащ коренообразуването. Тя е най-често използвана в процеса на вкореняване от групата на всички ауксини и има най-голямо значение за практиката, тъй като оказва стимулиращо влияние при коренообразуването върху най-голям брой растителни видове и не е токсична за растенията при по-голямо вариране на концентрациите (Mitov et al., 1980). Прилагана в оптимална доза от 1,25 μ M в хранителна среда MS, тя води до много добри резултати при вкореняване на ябълковите подложки M26 и M27 (Badshah et al., 1995).

Подобни резултати представят Gamage and Nakanishi (2000). Те експериментират вкореняване при някои ябълкови сортове. Прехвърлят получени регенеранти от листни експлант върху хранителна среда MS със съдържание на IBA 1,25 μ M. В резултат на това получават добре вкоренени микрорастения.

Klerk et al. (1995) анализират проблема по-задълбочено, разглеждайки комплексното влияние на комбинацията IBA, 2,4-Д и NAA върху различните фази на коренообразуване на ябълковата подложка York 9 и установяват, че IBA има високостимулиращ ефект по време на фазата индукция и слаб инхибиращ ефект по време на фазата морфологично диференциране на корените. По-слабо стимулиращо действие оказва 2,4-Д по време на първата фаза от коренообразуването, а силно инхибиращо - по време на морфологичното диференциране. В този експеримент NAA се явява високостимулираща през фазата индукция и силно инхибираща по време на фазата морфологично диференциране на корените.

В същата насока, но независимо едни от други, работят Matos - Brifo et al. (1995). Те получават висок процент на добре вкоренени регенеранти, използвайки отново хранителна среда MS, съдържаща 0,49 μ M IBA и 0,54 μ M NAA.

В световната експериментална работа по вкореняване на регенеранти, получени чрез соматичен органогенезис от листна тъкан, се разглеждат не само ауксините като главен ризогенен фактор, но и някои други компоненти. Такива например са комплексните минерални соли. Изпитва се 100% минерален състав на хранителна среда MS, добавен към IBA в концентрация 0,1 mg/l, и се установява, че това води до максимално вкореняване на микрорастения от ябълкови подложки (Correa et al., 1994).

Опитите по разглеждане проблем включват и използване на хранителни среди с намален наполовина минерален състав на MS в комбинация с подходящ ауксин. Sun et al. (2000) работят с дивия вид *Malus robusta*. Те прехвърлят регенеранти от листни сегменти върху хранителна среда MS с 1/2 минерален състав,



като включват и 0,5 mg/l IBA, при което получават добре вкоренени микрорастения.

Най-често използвана както за вкореняване, така и за всички предхождащи го процеси в микроразмножаването е стандартната модифицирана MS среда. Тя обаче, в стремежа на изследователите за намиране на по-ефективна, бива заменена с алтернативни такива в редица експерименти.

Machnik and Lisek (1995) изпитват по-високи концентрации на IBA, като ги включват в състава на хранителната среда Woody Plant Medium (WPM). Използват 0,5-1,0-1,5 mg/l IBA, които проявяват отличен ризогенен потенциал.

Подобни резултати са налице и при Jouira et al. (2000). Те експериментират със среда на Driver-Kuniyuki (DKW), в чийто състав включват 2,5 μ M IBA.

Други автори в комбинация с доказани вече ризогени изпитват в експериментите си и фактори като светлина и тъмнина. Микрорастения от ябълковата подложка MM111, получени чрез соматичен органо-генезис, са вкоренени успешно при използване на 2,5 μ M IBA, съчетано с поставяне на регенерантите периодично на тъмно и светло за определен период от време. Тези от тях с по-голяма експозиция на тъмнина усвояват по-рационално използвания ауксин и образуват повече корени, с по-голяма дължина (Hozain, 1995).

В експерименталната работа по разглеждания проблем място намират и синтетичните ауксини както самостоятелно, така и в комбинация. Това са голяма група вещества с различен строеж и свойства, които представляват аналози на природните фитохормони (Branca et al., 1993). Те биват синтетични стимулатори и синтетични инхибитори. Към групата на синтетичните стимулатори се отнасят синтетичните ауксини, които имат по-висока биологична активност и по-многообразен механизъм на действие от природните ауксини. Това е предпоставка за използването им в различни отрасли на растениевъдството, в т.ч. и в овощарството (Kerin i Berova, 2001).

Един от синтетичните стимулатори на коренообразуването при микрорастения е 1,2-benzisoxazole-3-acetic acid (BOA). Автори като Caboni and Tonelli (1999) търсят алтернативи на естествените ризогени. Те успешно използват в среда за вкореняване традиционните NAA, IBA и синтетичния BOA, но в определена комбинация. BOA, използван самостоятелно, не дава висок резултат при вкореняването на регенеранти, получени от листни експлантати на ябълка. Констатациите в крайна сметка са, че ниската активност на BOA като ризоген не му дава възможност нито да влезе в групата на рутинно използващите се коренообразуватели, като NAA и особено IBA, нито да ги замени в каквато и да е степен.

Други автори, в стремежа си за откриване на максимално ефективната среда за вкореняване, експериментират многофакторно. Lisek (1996) изпитва три хранителни среди за вкореняване на ябълковата подложка P59 - MS, 1/2 MS и WPM, включващи IBA, различен тип агар, L-пролин и флороглюцинал. Най-висок ризогенен потенциал е установен при хранителната среда WPM с 1,0 mg/l IBA, 6 g/l агар от типа Shoen и 200 mg/l L-пролин. При използването на флороглюцинал се получил негативен ефект върху коренообразуването на изпитваните регенеранти от ябълковата подложка P59.

От литературното изложение дотук можем да направим заключение, че в световната експериментална работа по успешното вкореняване на регенеранти, получени чрез соматичен органо-генезис от листни експлантати, авторите насочват своето внимание към доброто познаване и прецизиране на състава на хранителните среди. Композирането им може да бъде направено по различен начин, а тяхното оптимизиране, съобразно всеки генотип, може да доведе до очаквания положителен ефект.

Проучванията по този немаловажен проблем трябва да продължат по-задълбочено и занапред. Изследователите, имащи намерение да работят в тази сфера и у нас, е нужно да обърнат полагашото се внимание на този така актуален въпрос, свързан с бъдещето на овощарството в България.

LITERATURA

- Dobrevska, G., 2008. Disertatsiya, Plovdiv, 116-117.
- Dobrevska, G., K. Ivanova, 2011. Izsledvaniya varhu nyakoi faktori, okazvashti vliyanie varhu regeneratsionnata sposobnost na listni eksplanti ot yabalkovata podlozhka M9. – Agrarni nauki, III, 7, 5-7.
- Mitov, P., G. Pepelyankov, D. Dyakov, 1977. Izpolzvanе na rastezhnite regulatori v ovoshtarstvoto, Obzor, Sofia, TSNTII pri MZHP.
- Mitov, P., G. Pepelyankov, D. Dyakov, A. Stoyanov, A. Uzunov, 1980. Prilozhenie na rastezhnite regulatori v ovoshtarstvoto, Plovdiv.
- Kerin, V., M. Berova, 2001. Rastezhni regulatori v rastenievadstvoto. Videnov i sin, Sofija.
- Branca, C., A. Ricci, A. Torelli, M. Bassi, 1993. Effect of 1,2-benzisoxazole-3-acetic acid on plant regeneration from protoplasts of *Nicotiana tabacum*. – Plant Cell Reports, 12 : 3, 121-124.
- Caboni, E., M. G. Tonelli, 1999. Effect of 1,2-benzisoxazole-3-acetic on adventitious shoot regeneration and in vitro rooting in apple. – Plant Cell Reports, 18: 12, 985-988.
- Correa, D.-de-M., M. Pasqua, J. S. Ishida, A. A.-de Alvarenda, J. D. Ramos, A. A.-De-Alvarenda, 1994. Effects of indole butyric acid and mineral salts on in

- vitro rooting of apple rootstock MI-793 shoots. – *Revista Ceres*, 41: 236, 379-385.
- Crow, W. D., W. Nicholls, M. Sterns, 1971. Root inhibitors in *Eucalyptus grandis*: naturally occurring derivatives of the 2, 3-dioxabicyclo [4. 4. 0] decane system. – *Tetrahedron Lett*, 18: 1353-1456.
- Curir, P., A. Mercuri, S. Sulis, 1990. Rooting of *Eucalyptus gunnii* Hook cuttings in different physiological states. – In: Loreti M. (ed) *Abstr 23 rd Int Hort Cong*, ISHS, University Press, Florence, p. 4067.
- Gamage, N., T. Nakanishi, 2000. In vitro shoot regeneration from leaf tissue of apple (cultivar "Orine"): High shoot proliferation using carry over effect of TDZ. – *Acta Hort. (ISHS)*, 520, 291-300.
- H. Ben Jouira, C. Bigot, V. Dorion, 2000. Plant regeneration from leaves of *Ulmus* X "Commelin". – *Acta. Hort. (ISHS)* 520 : 281-290.
- Greene, D. W., 2010. The development and use of plant bioregulators in tree fruit production. – *Acta Hort. (ISHS)*, 884: 31-40.
- Hozain, M. I. M., 1995. Effect of various media on micropropagation of MM 111 apple rootstock. *Plant physiology*, Jul, Amman, Jordan, 127-133.
- Jouira, H. B., C. Bigot, V. Dorion, 2000. Plant regeneration from leaves of *Ulmus* x "Commelin". – *Acta. Hort. (ISHS)* 520 : 281-290.
- Klerk, G. J., M. Terzi, R. Cella, A. Falavigna, 1995. Hormone requirements during the successive phases of rootstock of *Malus* microcuttings. Current issues in plant molecular and cellular biology. – In: *Proceedings of the 8-th international congress on plant tissue and cell culture*, 12-17 June, Florence, Italy, 111-116.
- Lee, C. H., S. V. Kim, I. M. Choi, N. I. Hyung, 1990. Effect of growth regulators and medium composition on the growth of lach stage in shoot tip culture of apple rootstock M 26. – *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, v. 31, 4, 385-392.
- Lisek, A., 1996. Rooting in vitro of Polish dwarf rootstock P59. – *J. Fruit Orn. Plant Res.*, 4 (1):1-9.
- Machnik, B., A. Lisek, 1995. Propagation in vitro of Polish dwarf apple rootstock. *Materiały ogólnopolskiej konferencji : naukowej Nauka Practice Ogrodniczej z okazji XXV - lecia Wydziału Ogrodniczego Akademii Rolniczej w Lublinie*, 77-80.
- Matos-Brifo, A. E., M. S. da Costa, W. Handro, 1995. Morphogenesis and plant regeneration in leaf explants and callus tissues of *Capraria biflora* cultured in vitro. – *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 7 (2); 171-174.
- Murashige, T., F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. – *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Bardshah, N., N. Rahman, M. Zubair, 1995. Effect of indolebutyric acid (IBA) on the cuttings of M 26 and M 27 apple rootstocks. – *Sarhat Journal of Agriculture*, 11 : 4, 440-453.
- Sun, J., Z. Zhen, Y. Q. Hong, S. Bing S., Huang-Xiaomin, F. H. Qin, 2000. Plant regeneration from explants of apple and *Malus robusta*. – *Acta Agricultural Shanghai*, 16 : 2, 23-30.

Статията е приета на 7.03.2012 г.

Рецензент – доц. д-р Валентин Личев

E-mail: vlichev@abv.bg