

ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ВЪЗМОЖНОСТИТЕ ЗА ПОЕВТИНЯВАНЕ НА IN VITRO МУЛТИПЛИКАЦИЯТА НА ЯГОДА СОРТ "СЕЛВА"

Л. Начева, П. Герчева

Институт по овощарство – Пловдив

STUDY ON THE POSSIBILITIES OF CHEAPER IN VITRO STRAWBERRY CV. "SELVA" MULTIPLICATION

L. Nacheva, P. Gercheva

Fruit Growing Institute – Plovdiv

РЕЗЮМЕ

Институт по Овощарство – Пловдив има дългогодишен опит в размножаването на сортове ягоди *in vitro* както за експериментални цели, така и като част от програмата на Завода за производство на овощен, лозов и ягодов посадъчен материал.

Целта на настоящото изследване бе да се проучат възможностите за поевтиняване на микроразмножаването на ягоди чрез използване на различни въглехидратни източници в хранителната среда (захароза, глюкоза, обикновена захар и сорбитол) и перлит като заместител на агара в етап мултипликация.

Изпитани са варианти на хранителна среда MS с добавка на различни въглехидратни източници – 30 g захароза, 30 g глюкоза, 30g сорбитол и 30 g обикновена захар. Всяка от средите е в две модификации – с агар като желиращ агент и течна (100 ml) в буркани със стерилен перлит като поддържащ растенията материал.

Използването на глюкоза в хранителните среди води до двукратно увеличение на коефициента на мултипликация при ягодовия сорт

SUMMARY

Fruit Growing Institute – Plovdiv has many years experience in *in vitro* multiplication of strawberry cultivars both for experimental goals and as a part from the program of the Commercial laboratory for production of orchard, vine and strawberry planting material.

The present research aims to study the possibilities of cheaper strawberry micropropagation by using different sources of carbohydrates in the nutrient medium (sucrose, glucose, table sugar and sorbitol) and perlite as a substitute of the agar in the multiplication stage.

Variants of nutrient media MS with addition of different sources of carbohydrates – 30 g sucrose, 30 g glucose, 30 g sorbitol and 30 g table sugar - are tested

Each medium has two modifications – with agar as a jelly agent and liquid one (100 ml) in jars with sterile perlite as a supporting material for the plants.

The use of glucose in the nutrient media leads to double increase of the multiplication rate of strawberry cv. Selva

„Селва“ в сравнение със захарозата. В производствени условия това би довело до получаване на два пъти повече висококачествени растения и съответно до намаляване на себестойността им. Допълнително намаляване на производствените разходи може да се постигне чрез замяна на скъпоструващи компоненти на средата като агар и захароза или глюкоза с по-евтини – съответно перлит и обикновена захар.

Ключови думи глюкоза, перлит, ягоди, обикновена захар, микроразмножаване

Използувани съкращения: BAP - 6-benzylaminopurine; IBA - indole-3-butyric acid; DMRT - Duncan's Multiple Range Test.

УВОД

В периода на присъединяване на България към ЕС с особена актуалност се налага необходимостта от производство на сертифициран овощен посадъчен материал. Важно място в този процес заема изборът и производството на подходящи, свободни от вируси сортове ягоди, които автентично предават биологичните и морфологични свойства на майчиното растение, изравнени са и осигуряват високо и редовно плодоваване. Поради тази причина от голямо значение е да се оптимизират методите за масовото им размножаване в *in vitro* условия.

Първите съобщения в литературата за успешно *in vitro* размножаване на сортове ягоди датират от 70^{те} години на

сравнено с това на захарозата. Това би довело до получаване на два пъти повече висококачествени растения в производствени условия и до намаляване на цената на растенията съответно.

Допълнително намаляване на производствените разходи може да се постигне чрез замяна на скъпоструващи компоненти на средата като агар и захароза или глюкоза с по-евтини – перлит и обикновена захар.

Key words: glucose, perlite, strawberries, table sugar, micropropagation

Abbreviations: BAP - 6-benzylaminopurine; IBA - indole-3-butyric acid DMRT - Duncan's Multiple Range Test

INTRODUCTION

In the period of Bulgaria's accession to the EU the need of certified planting material for fruit crops production has a special actuality.

The choice and production of suitable, virus-free strawberry cultivars that hand down the same biologic and morphologic features of the mother plant have important role in this process.

These features are equalized and provide high and regular fruit bearing.

For that reason the optimization of the methods for their mass multiplication in *in vitro* conditions is very important.

The first reports in literature of successful *in vitro* multiplication of strawberry cultivars date from the 70s of the last century.

After the first experiments of Vine (1968), Boxus (1974)

миналия век. След първите опити на Vine (1968), Voxus (1974) разработва методика за микроразмножаване на ягоди. Към техниката е проявен огромен интерес от големите производители на посадъчен материал. В момента по този метод в света се произвеждат милиони растения. Институт по Овощарство – Пловдив има дългогодишен опит в размножаването на сортове ягоди както за експериментални цели, така и като част от програмата на Завода за производство на овощен, лозов и ягодов посадъчен материал. Интересът ни към проблема се обуславя от необходимостта за непрекъснато подобряване на съществуващите технологии. Подобни изследвания се извършват в редица лаборатории, независимо от дългогодишния опит с тези култури. Те са насочени към оптимизиране на методиката с цел поевтиняване на производствения процес и преодоляване на някои физиологични проблеми като встъкляването на *in vitro* растенията.

Целта на настоящото изследване бе да се проучат възможностите за поевтиняване на микроразмножаването на ягоди чрез използване на различни въглехидратни източници в хранителната среда (захароза, глюкоза, обикновена

elaborates methods for micropropagation of strawberries.

The huge nurseries show their big interest in that technique.

Now by this method millions of plants are produced.

Fruit Growing Institute – Plovdiv has many years experience in *in vitro* multiplication of strawberry cultivars both for experimental goals and as a part from the program of the

Commercial laboratory for production of orchard, vine and strawberry planting material.

Our interest in the problem is determined by the necessity of incessant improvement of the existing technologies.

Similar researches are carried out in many laboratories, regardless of the many years experience with these cultures.

They are directed to optimization of the methods in order the production process to become cheaper and some physiologic problems like vitrification of the *in vitro* plants to be surmounted.

The present research aims to study the possibilities of cheaper strawberry micropropagation by using different sources of carbohydrates in the nutrient medium (sucrose, glucose, table

захар и сорбитол) и перлит като заместител на агара в етап мултипликация.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал

Изследванията са проведени в лабораторията по биотехнология на Институт по Овощарство – Пловдив през 2007 и 2008 г. с ягодовия сорт Селва.

Изходните растения са свободни от вируси и се отглеждат в Институт по Овощарство – Пловдив при непрекъснат фитосанитарен контрол.

Въвеждане в *in vitro* култура

Веgetативни връхчета от изследваните генотипи са взимани през оптималния срок – втората половина на април и началото на май.

Стерилизацията на експлантите е извършена по стандартна процедура:

- Промиване с течаща вода за 1 час;
- 95% етилов алкохол за 30 sec.;
- Калциев хипохлорит (5% разтвор) с продължителност на стерилизацията 5, 7 и 9 минути;
- Промиване със стерилна дестилирана вода трикратно за 1, 5 и 10 минути.

Така обработените експлантите са залагани в хранителни среди на базата на

sugar and sorbitol) and perlite as a substitute of the agar in the multiplication stage.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

The research is made in the Biotechnological laboratory at the Fruit Growing Institute Plovdiv in 2007 and 2008 with the strawberry cv. Selva.

The source plants are virus-free and are grown in the Fruit Growing Institute – Plovdiv having permanent phytosanitary control.

Establishment of *in vitro* culture

Vegetative buds from the studied genotype were taken during the optimum period – the second half of April and the beginning of May.

The sterilization of the explants is made in regard to the standard procedure:

- Washing with tap water for 1 hour;
- 95% ethanol – 30 sec;
- Calcium hypochlorite (5 % solution) with duration of the sterilization 5, 7 and 9 minutes;
- Washing with sterile distilled water three times for 1, 5 and 10 min.

Thus treated explants are set on nutrient media based on MS (Murashige and Skoog, 1962) both

MS (Murashige and Skoog, 1962) с и без добавка на растежни регулатори.

Мултипликация

С ягодовия сорт Селва са проведени две серии опити. Хранителните среди за първата серия са представени в таблица 1.

with and without growth regulators.

Multiplication

Two series of experiments are made with the strawberry cv. Selva.

The nutrient media for the first series are presented in Table 1.

Таблица 1. Хранителни среди за мултипликация на ягоди сорт Селва
Table 1. Nutrient media for multiplication of strawberry cv. Selva

Варианти Variants	Макроелементи Macroelements	BAP mg/l	IBA mg/l	Захароза sucrose g/l
ST1	MS	0.56	0.001	30
ST2	50% MS	0.56	0.001	30
ST3	MS	0.28	0.001	30
ST4	50%MS	0.28	0.001	30

За втората серия опити като основна хранителна среда е подбрана ST1, показала най-добри резултати в първия опит. Изпитани са четири варианта на средата с добавка на различни въглехидратни източници – 30 г захароза, 30 г глюкоза, 30 г сорбитол и 30 г обикновена захар. Всяка от средите е в две модификации – с агар като желиращ агент и течна (100 ml) в буркани със стерилен перлит като поддържащ растенията материал.

Растенията са залагани в стъклени буркани с прозрачен капак. При опитите във всеки буркан са залагани по 10 единични растения в три

Nutrient medium ST1, which showed the best results in the first experiment is chosen for the second experiment.

Four variants of medium with addition of different carbohydrates – 30 g sucrose, 30 g glucose, 30 g sorbitol and 30 g table sugar, are tested.

Each medium has two modifications – with agar as a jelly agent and liquid one (100 ml) in jars with sterile perlite as a supporting material for the plants.

The plants are put in glass jars with transparent lid. In the experiments 10 single plants in

повторения за всяка хранителна среда.

След 4 седмично култивиране на съответните хранителни среди са отчитани следните показатели:

- Коефициент на мултипликация;
- Прираст на едно растение на база свежо тегло (FW);
- Прираст на едно растение на база сухо тегло (DW).

Вкореняване

Микрорастенията са вкоренявани на безхормонална хранителна среда по MS обогатена с 20 g/l захароза. Залагани са 15 растения в буркан в 4 повторения. Процентът на вкореняване е отчетен на 20^{тия} ден.

Всички *in vitro* растения са култивирани в камера с температура $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ и фотопериод 16/8 часа ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD).

Адаптация

Адаптацията на растенията се извършва в саксийки с торфено-перлитна смес, поставени във влажни камерки, при температура $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ и фотопериод 16/8 часа ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD).

Статистическа обработка на резултатите

Получените резултати са обработени статистически чрез анализ на варианса и стойностите са разпределени чрез теста на Дънкан (Duncan's

three repetitions for each nutrient medium are put in each jar.

After 4 week cultivation on the respective nutrient media the following parameters are reported:

- Multiplication rate (Km);
- Growth of a single plant on the basis of its fresh weight (FW);
- Growth of a single plant on the basis of its dry weight (DW).

Rooting

The microplants are rooted in hormonal-free nutrient media on MS, supplemented with 20 g/l sucrose. 15 plants in 4 repetitions are put in each jar. The percentage of rooting is reported on the 20th day.

All *in vitro* plants are cultivated in a camera with temperature $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and photoperiod 16/8 hours ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD).

Acclimatization

The adaptation of the plants is made in little pots with peat-perlite mixture, set in little damp cameras at temperature $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and photoperiod 16 hours ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD).

Statistic elaboration of the result

Data are analyzed by analysis of variance and the means are separated using the Duncan's multiple range test

multiple range test $P < 0.05$)

($P < 0.05$).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Стерилизация и въвеждане в култура

Използваните стерилизационни процедури са стандартни при работа с овощни видове и при всички варианти са получени 85–100% стерилни експланти. Най-подходящо по отношение преживяемостта на растенията се оказва 5 минутно третиране с калциев хипохлорит, при което се осигурява висока (над 85%) степен на обеззаразяване, експлантите са свежи, зелени и жизнени и имат висока степен на адаптация към *in vitro* условия.

2. Микроразмножаване

Основна цел на опитите с ягоди сорт Селва е оптимизиране и поевтиняване на съществуващите технологии. Това може да се постигне от една страна чрез повишаване на коефициента на мултипликация и подобряване на качеството на микрорастенията, а от друга – чрез поевтиняване на съставките на хранителните среди.

За постигане на тази цел опитите са изведени на два етапа.

Проведени са експерименти за определяне на влиянието на макроелементите и растежните регулатори върху коефициента на мултипликация и физиологичното състояние на

RESULTS AND DISCUSSION

1. Sterilization and establishment of *in vitro* culture

The used procedures of sterilization are standard for fruit-trees and for all variants 85–100% sterile explants are received.

The most suitable in regard to the survival of the plants appeared the 5 minutes treating with calcium hypochlorite which provide high (above 85 %) level of disinfection.

The explants are fresh, green and have high level of adaptation to *in vitro* conditions.

2. Micropropagation

Main goal in the experiments with strawberries cv. Selva is optimization of the existing technologies and making them cheaper.

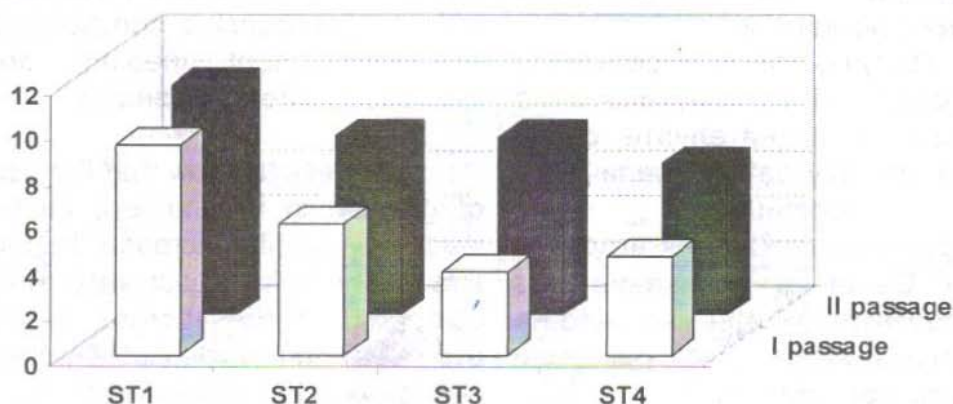
This can be achieved by increase in the multiplication rate and improvement of the quality of microplants on the one hand, and by making cheaper the ingredients of the nutrient media on the other hand.

To achieve that goal the experiments are made in two stages.

Experiments for determination the influence of the macroelements and the growth regulators upon the coefficient of multiplication and physiologic condition of the plants (Figure 1)

растенията (фигура 1).

are carried out.



Фиг. 1. Влияние на състава на хранителните среди върху коефициента на мултипликация (Км) при ягоди сорт Селва след първи и втори пасаж
Fig. 1. Effect of nutrient media on the multiplication rate (Km) of strawberry cv. Selva after 1st and 2nd passage

На всички хранителни среди микрорастенията са свежи, зелени, без встъкляване, с добре оформени листа. По отношение на коефициента на мултипликация най-добри резултати както в първия, така и във втория пасаж са отчетени на среда ST1 с коефициент на мултипликация съответно 9.33 и 10.12. Тази среда е използвана за базова при следващите опити.

Основна цел на следващите експерименти е оптимизиране на методите за *in vitro* размножаване на сортове ягоди за снижаване на производствените разходи. Идеята е да се постигне висок

On all nutrient media the plants are fresh, green, without vitrification, with well-formed leaves.

Regarding the multiplication rate the best results both in the first and second passage are reported on medium ST1 with coefficient of multiplication 9.33 and 10.12 respectively.

This medium is used as base also in the following experiments.

Main goal in the following experiments is optimization of the methods for *in vitro* multiplication of strawberry cultivars in order the production expenses to be

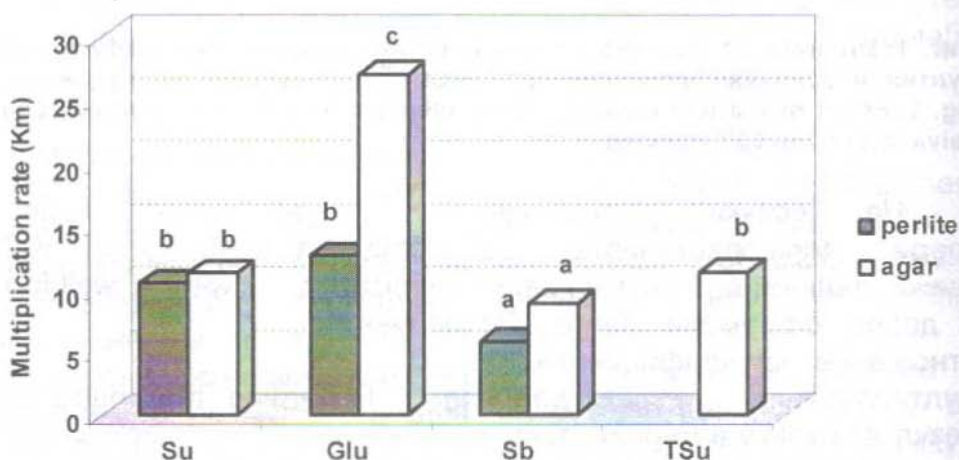
коефициент на мултипликация и отлично качество на растенията при замяна на скъпо струващи компоненти на хранителната среда с по-евтини.

Получените резултати показват, че използването на глюкоза в хранителните среди води до двукратно увеличение на коефициента на мултипликация (Km) на ягодовия сорт Селва в сравнение със захарозата при еднакво ниво на използваните растежни регулатори (фигура 2).

reduced.

The idea is a high coefficient of multiplication and excellent quality of the plants to be achieved when the expensive components of the nutrient medium are replaced by cheaper ones.

The results show that the use of glucose in the nutrient media leads to double increase in the strawberry multiplication rate (Km) compared to the sucrose where the level of the used growth regulators is the same (Figure 2).



Фиг. 2. Коефициент на мултипликация на ягоди сорт Селва на хранителни среди с различен въглехидратен източник – захароза (Su), глюкоза (Glu), сорбитол (Sb) и обикновена захар (TSu). Различните букви на всяка колонка показват значима разлика ($P < 0.05$) по Дънкан (DMRT)

Fig. 2. Multiplication rate of strawberry cv. Selva on nutrient media with different sources of carbohydrates – sucrose (Su), glucose (Glu), sorbitol (Sb) and table sugar (TSu). Different letters within each column indicates significant difference ($P < 0.05$) by DMRT

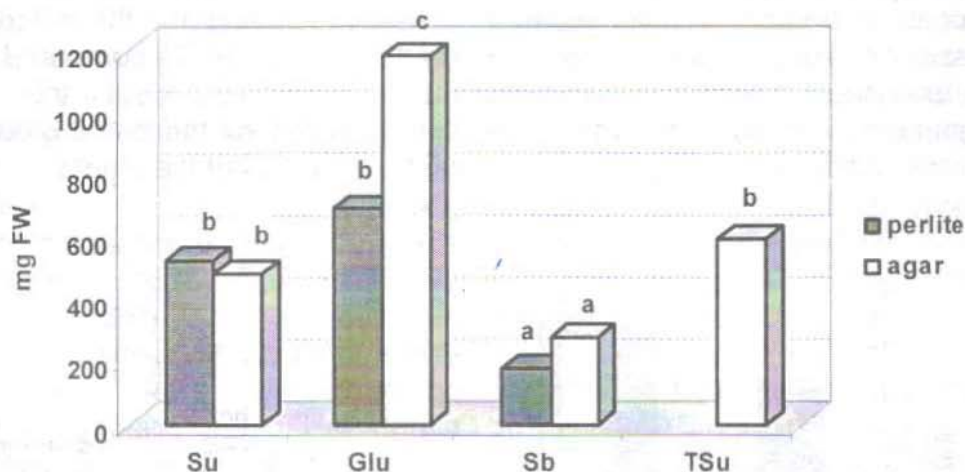
Растенията са свежи, зелени, без встъкляване. Доброто физиологично състояние на микрорастенията

The plants are fresh, green, without vitrification.

The good physiologic status of the microplants is confirmed by

се потвърждава от данните за прираста на едно растение на база свежо и сухо тегло (фигури 3 и 4).

the data for the growth of a single plant on the basis of both its fresh and its dry weight (Figures 3 and 4).



Фиг. 3. Прираст на едно растение (по свежа маса) при култивиране на хранителни среди с различни въглехидрати – захароза (Su), глюкоза (Glu), сорбитол (Sb) и обикновена захар (TSu). Различните букви на всяка колонка показват значима разлика ($P < 0.05$) по Дънкан (DMRT)

Fig. 3. Growth of a single plant on nutrient media with different sources of carbohydrates – sucrose (Su), glucose (Glu), sorbitol (Sb) and table sugar (TSu) on the basis of its fresh weight. Different letters within each column indicates significant difference ($P < 0.05$) by DMRT

Опити с обикновена захар са провеждани само на твърда хранителна среда. На тези варианти както Км, така и прираста на едно растение са сравними или по-добри, отколкото при използване на захароза. Включването на сорбитол в средите за мултипликация на ягода не доведе до очакваните добри резултати. Установено е снижаване на Км и прираста на растенията. Резултатите по отношение на изследваните

Experiments with table sugar are carried out only on hard nutrient media.

On these variants both the multiplication rate and the growth of a single plant are comparable or better in regard to the use of sucrose.

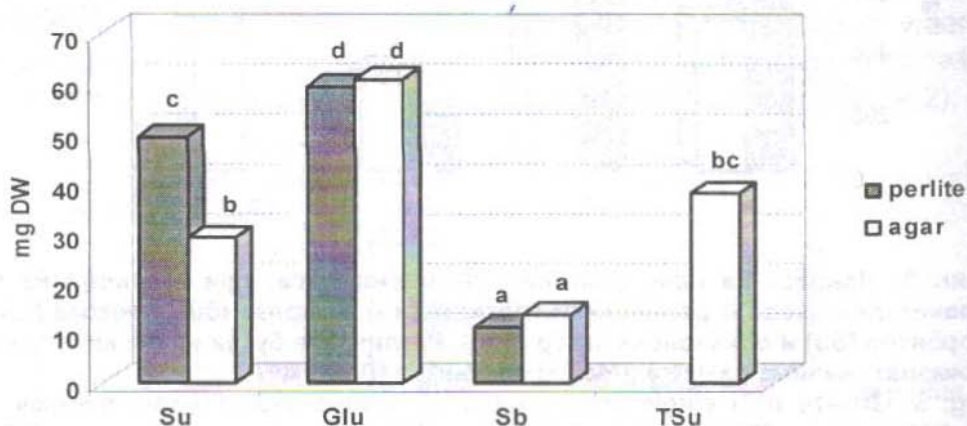
The inclusion of sorbitol in the media for strawberry multiplication does not lead to the expected good results.

Decrease in the multiplication rate and the growth of the plants is determined.

показатели са еднопосочни при среди на агарова основа и при течни среди с перлит. Характерно е получаването на по-нисък Км при глюкозата на среди с перлит в сравнение с тези с агар, но това се компенсира от изравнения прираст на сухата маса на растенията.

The results in regard to the studied indicators are definite in media based on agar and in liquid media with perlite.

A typical feature is the lower multiplication rate for the glucose on media with perlite compared to those with agar, but this is compensated by the equal growth of the dry mass of the plants.



Фиг. 4. Прираст на едно растение (по суха маса-DW) при култивиране на хранителни среди с различни въглехидрати – захароза (Su), глюкоза (Glu), сорбитол (Sb) и обикновена захар (TSu). Различните букви на всяка колонка показват значима разлика ($P < 0.05$) по Дънкан (DMRT)

Fig. 4. Growth of a single plant on nutrient media with different sources of carbohydrates – sucrose (Su), glucose (Glu), sorbitol (Sb) and table sugar (TSu) on the basis of its dry weight (DW). Different letters within each column indicates significant difference ($P < 0.05$) by DMRT

Вариантите на хранителните среди са подбрани въз основа на предишния опит на екипа и литературни данни. В последните години на този проблем в научната литература се обръща все по-голямо внимание. Проучва се влиянието на въглехидратите върху процесите на

The variants of the nutrient media are chosen in regard to the previous experience of the team and data from the literature. In the recent years the scientific literature pays more and more attention to that problem.

The influence of the carbohydrates upon the processes of micropropagation, differentiation

микроразмножаване, диференциация и дедиференциация на растителните тъкани, хабитуса и физиологичното състояние на растенията *in vitro*. Наред с традиционно използваната захароза като съставка на хранителните среди се изпитват сорбитол, глюкоза, фруктоза, манитол и др. Проведените експерименти с ягодовия сорт Селва потвърждават, че въглехидратният състав на средата може силно да повлияе успеха на *in vitro* култивирането. Най-добри варианти за микроразмножаване на ягода в нашите експерименти са тези с глюкоза в агарова хранителна среда. Това вероятно се дължи на по-пълното усвояване на глюкозата от хранителната среда в сравнение със захарозата (Borkowska, 2000). Прилагането на тази среда в производствени условия би довело до получаване на два пъти повече висококачествени растения и съответно до намаляване на тяхната себестойност. Допълнително намаляване на производствените разходи може да се постигне чрез замяна на скъпоструващи компоненти на средата като агар и захароза или глюкоза с по-евтини – съответно перлит и обикновена захар. Нашият екип има опит в използването на течна среда с перлит или други инертни

and dedifferentiation of the plant tissues, the habitus and the physiologic condition of the *in vitro* plants is studied.

Besides the traditionally used sucrose as an ingredient of the nutrient media sorbitol, glucose, fructose, manitol, etc. are tested.

The experiments carried out with the strawberry cv. Selva confirm that the carbohydrate content of the medium can influence in great extent the success of the *in vitro* cultivation.

The best variants for strawberry micropropagation in our experiments are those where glucose is used in the agar nutrient medium.

One possible reason is that compared to sucrose glucose is depleted nearly completely from the nutrient medium (Borkowska, 2000).

The use of such medium in production conditions could lead both to double increase in the number of high-quality plants and to decrease in their cost price. Additional decrease in the production expenses can be achieved by replacement of the expensive components of the medium as agar and sucrose or glucose with cheaper ones – perlite and table sugar respectively.

Our team has experience in the use of liquid medium with perlite or other inert carriers in the

носители във фаза вкореняване на вегетативни подложки от семкови и костилкови овощни видове. Съобщения за опити за замяна на агара в хранителната среда с други инертни носители има и в научната литература. Neeru и съав. (2000) съобщават за повишаване ефективността на микроразмножаването на ягода чрез използване на течна хранителна среда и нагънат медицински бинт като поддържащ материал. С цел понижаване на разходите и подобряване качеството на микрорастенията при вкореняване на ягода (сорт Довер) Mohan и съав. (2005) заменят агара с целулозен екстракт от захарно цвекло и течна среда. Считаме, че това направление на работа е много перспективно и след допълнително оптимизиране на състава на течната среда резултатите по отношение Км ще са съизмерими с тези на агар при значително съкращаване на производствените разходи във фаза мултипликация.

3. Вкореняване и адаптация

Всички микрорастения на ягодилия сорт Селва с лекота се вкореняват на безхормонална хранителна среда, поради което не са проведени допълнителни изследвания в това направление.

Вкоренените растения са адаптирани успешно към

rooting phase of vegetative rootstocks from seed and stone fruit-tree types.

In the scientific literature there are reports of experiments for replacement of the agar in the nutrient medium with other inert carriers.

Neeru et al. (2000) reported about enhancing micropropagation efficiency of strawberry by using liquid medium with some layers of surgical bandage as a supporting material.

Mohan et al. (2005) substituted the agar with sugarcane bagasse with liquid medium with aim to reduce the costs and improve the quality of strawberry plantlets cv. Dover at the rooting stage.

We consider that this trend of work is very perspective and after additional optimization of the content of the liquid medium the results in regard to multiplication rate will be comparable to those of the agar with significant reduction of the production expenses in the multiplication phase.

3. Rooting and adaptation

All microplants from the strawberry cv. Selva rooted easy on hormone-free nutrient medium and for that reason, additional experiments in this direction are not carried out.

All rooted plants are adapted successfully to outside conditions

външни условия и ще бъдат използвани в експерименталната работа в ИО – Пловдив

and will be used in the experimental work of Fruit Growing Institute – Plovdiv.

ИЗВОДИ

Използването на глюкоза в хранителните среди води до двукратно увеличение на коефициента на мултипликация (Km) при ягодовия сорт Селва в сравнение със захарозата при еднакво ниво на използваните растежни регулатори;

Коефициентът на мултипликация и прирастът на едно растение са сравними или по-добри на варианти с обикновена захар в сравнение с използване на захароза;

Коефициентът на мултипликация на среди с перлит е по-нисък в сравнение с тези с агар, но това се компенсира от изравнения прираст на сухата маса на растенията;

Всички микрорастения на ягодовия сорт Селва с лекота се вкореняват на безхормонална хранителна среда.

Благодарности

Представената разработка е част от проект БМ-36/2005 към НФ"НИ" при МОН.

CONCLUSIONS

The use of glucose in the nutrient media leads to double increase of the multiplication rate (Km) of strawberry cv. Selva compared to the sucrose where the level of the used growth regulators is the same;

In the variants with table sugar both the Km and the growth of a single plant are comparable or better than those with the use of sucrose;

The multiplication rate of strawberry cv. Selva on media with perlite is lower than that with agar, but this is compensated by the equal growth of the dry mass of the plants;

All microplants from the strawberry cv. Selva are rooted with ease on hormone-free nutrient medium.

Acknowledgements

This research is a part of the project BM-36/2005, supported by National Science Fund, Ministry of Education and Science, Bulgaria.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Borkowska B.**, 2000. Development and physiological status of micropropagated strawberry plants rooted ex vitro and planted to different substrates. *Acta Horticulturae*, 530, 333-338.
2. **Boxus P. H.**, 1974. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *J. Hort. Sci.*, 49, 209-210.
3. **Mohan R., E. Chui, L. Biasi, C. Soccol**, 2005. Alternative Invitro

Propagation: Use of Sugarcane Bagasse as a Low Cost Support Material During Rooting Stage of Strawberry Cv. Dover. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48, 37-42.

4. **Murashige T., F. Skoog**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.

5. **Neeru S., Ranjan S., Singh, O., S. Gosal**, 2000. Enhancing micropropagation efficiency of strawberry using bandage in liquid media. *J. Appl. Hort.* 2, 92-93.

6. **Vine S. L.**, 1968. Improved culture of apical tissues for production of virus-free strawberries. *J. Hort. Sci.*, 43, 293-7.