

МИКРОРАЗМНОЖАВАНЕ НА КЛОНОВА ПОДЛОЖКА ЗА ЧЕРЕША GISELA 6 (PRUNUS CERASUS X PRUNUS CANESCENS)

Л. Начева, П. Герчева

Институт по овощарство – Пловдив

MICROPROPAGATION OF ROOTSTOCK FOR CHERRY GISELA 6 (PRUNUS CERASUS X PRUNUS CANESCENS)

L. Nacheva, P. Gercheva

Fruit Growing Institute – Plovdiv

РЕЗЮМЕ

Важен елемент на съвременното овощарство е създаването на нови подложки за отделните овощни видове и проучването на поведението им в различни сортоподложкови комбинации при разнообразни почвени и климатични условия. По тази причина от голямо значение е да се разработят методи за масовото им размножаване *in vitro* условия.

Целта на настоящето изследване бе да се разработи ефективна система за размножаване на черешовата подложка Gisela 6 (*Prunus cerasus* X *Prunus canescens*).

В опитите са използвани 10 хранителни среди за мултипликация. Проучено е влиянието на включените в средите макроелементи (MS и QL), растежни регулатори и въглехидрати върху коефициента на мултипликация и височината на микрорастенията.

Най-добри резултати са получени на хранителни среди VM4 (MS соли, 2.5 µM BAP, 0.005 µM IBA, захароза 15g/l и сорбитол 15g/l) и VM6 (MS соли, 2.5 µM BAP, 0.057 µM IAA, захароза 15g/l и сорбитол 15g/l). Използуването на комбинация от

SUMMARY

An important element in modern fruit-growing is the establishment of new rootstocks for the fruit species and carrying out studies on their habits in different cultivar-rootstock combinations under varied soil and climatic conditions.

That is why it is very important to develop methods for their mass propagation under *in vitro* conditions.

The aim of the present study was to work out an efficient system of propagation of the sweet cherry rootstock Gisela 6 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*).

Ten nutrient media for multiplication were used in the experiment. The effect of the macroelements (MS and QL), growth regulators and carbohydrates included in the media, on the multiplication rate and on the height of the microplants was studied.

The best results were obtained on nutrient media VM4 (MS salts, 2.5 µM BAP, 0.005 µM IBA, 15 g/l sucrose and 15 g/l sorbitol) and VM6 (MS salts, 2.5 µM BAP, 0.057 µM IAA, 15 g/l sucrose and 15 g/l sorbitol).

сорбитол и захароза има положителен ефект върху развитието на микрорастенията, при което коефициентът на мултипликация нараства до 5 – най-висок от всички изпитвани варианти.

Ключови думи: Gisela 6, микроразмножаване, захароза, сорбитол

Използвани съкращения: BAP-6-benzylaminopurine; IBA-indole-3-butyric acid; NAA- α -naphthaleneacetic acid; IAA-indole-3-acetic acid; 2iP - 2-Isopentenyl-Adenin; TDZ – Thidiazuron; PPFD–photosynthetic photon flux density.

УВОД

Важен елемент на съвременното овощарство е създаването на нови подложки за отделните овощни видове и проучване на поведението им в различни сортоподложкови комбинации при разнообразни почвени и климатични условия. По тази причина от голямо значение е да се разработят методи за масовото им размножаване в *in vitro* условия, което би осигурило получаването на голямо количество генетично еднородни растения в кратки срокове.

Черешовата подложка Gisela 6 (*Prunus cerasus* X *Prunus canescens*) е умерено до слаборастяща и се счита за перспективна за развитието на модерни интензивни черешови насаждения. Изучаването и в почвено-климатичните условия на нашата страна би допринесло за развитието и интензифицирането на

Using the combination of sorbitol and sucrose had a positive effect on the development of microplants and the multiplication rate increased up to 5 – the highest of all the tested variants.

Key words: Gisela 6, micropropagation, sucrose, sorbitol

Abbreviations: BAP-6-benzylaminopurine; IBA-indole-3-butyric acid; NAA- α -naphthaleneacetic acid; IAA-indole-3-acetic acid; 2iP - 2-Isopentenyl-Adenin; TDZ – Thidiazuron; PPFD–photosynthetic photon flux density.

INTRODUCTION

An important element of modern fruit-growing is the establishment of new rootstocks for the fruit species and conducting studies on their habits in different cultivar-rootstock combinations under varied soil and climatic conditions.

That is why it is very important to develop methods for their mass propagation under *in vitro* conditions, which would provide for obtaining huge amounts of genetically uniform plants for a short period of time.

The sweet cherry rootstock Gisela 6 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) has a moderate to poor growth and it is considered to be perspective for the development of modern intensive sweet cherry plantations.

Studies on that rootstock under the soil and climatic conditions in our country will contribute to the development and

черешовото производство в България.

Понастоящем в научната литература не сме открили информация за отглеждането й в *in vitro* култура.

Целта на настоящето изследване бе да се разработи ефективна система за микроразмножаване на черешовата подложка Gisela 6.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал

Изследванията са проведени с черешовата подложка Gisela 6 в лабораторията по биотехнологии на Институт по Овощарство – Пловдив в периода 2006 – 2007 год.

Изходните растения са свободни от вируси и са отгледани в поле-изолатор на Институт по Овощарство - Пловдив при непрекъснат фитосанитарен контрол.

Въвеждане в *in vitro* култура

Вегетативни връхчета от подложката са взети в началото на вегетацията. Стерилизацията на експлантите е извършена по стандартна процедура:

- Промиване с течаща вода за 1 час;
- Спирт 30 сек.;
- 5% разтвор на калциев хипохлорит за 5, 7 или 9 минути;
- Трикратно промиване със стерилна дестилирана вода за 1,

intensification of sweet cherry production in Bulgaria.

Until now we have not found any information in scientific literature about its *in vitro* cultivation.

The aim of the present study was to work out an efficient system for micropropagation of the sweet cherry rootstock Gisela 6.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material

The experiments were carried out with the sweet cherry rootstock Gisela 6 at the Laboratory of Biotechnologies of the Fruit-Growing Institute – Plovdiv in the period 2006-2007.

The source plants were virus free and were grown in the isolated field of the Fruit-Growing Institute – Plovdiv under continuous phytosanitary control.

Establishment of *in vitro* culture

The vegetative shoots tips of the rootstock were collected in the beginning of vegetation.

The explant sterilization was conducted following the standard procedure:

- Washing with tap water for an hour;
- Alcohol – 30 sec.;
- 5% solution of calcium hypochlorite for 5, 7 or 9 minutes;
- Washing with sterile water

5 и 10 мин.

Така обработените експлантите са залагани в хранителни среди на базата на MS (Murashige and Skoog, 1962) с и без добавка на растежни регулатори.

Мултипликация

Използваните хранителни среди за мултипликация са представени в таблица 1.

three times for 1, 5 and 10 min.

The thus processed explants were plated on nutrient media based on MS (Murashige and Skoog, 1962) with and without growth regulators added.

Multiplication

The nutrient media used for multiplication were presented in Table 1.

Таблица 1. Хранителни среди за мултипликация на чершовата подложка Гизела 6

Table 1. Nutrient media for multiplication of cherry rootstock Gisela 6

Варианти Variants	Макроелементи Macroelements					Захароза Sucrose (Su) g/l	Сорбитол Sorbitol (Sb) g/l
	MS	BAP μM	IBA μM	NAA μM	IAA μM		
VM 1	MS	2.5	0.005			30	
VM 2	MS	2.5		0.005		30	
VM 3	MS	2.5			0.057	30	
VM 4	MS	2.5	0.005			15	15
VM 6	MS	2.5			0.057	15	15
VM 7	MS	2.5	0.005				30
C	LP	2.5	0.005			30	
M3	50%MS	1	0.005			30	
M4	MS	1	0.005			30	
M5	50%MS	2.5	0.005			30	

Връхчета с височина около 5-7 mm са залагани в епруветки с диаметър 22 mm с 5 ml хранителна среда.

След 3 седмично култивиране на съответните хранителни среди са отчетени брой новообразувани леторастчета над 5 mm (коефициент на мултипликация – Km) и средна височина на леторастче.

Вкореняване

Shoots about 5-7 mm were set in test-tubes (a diameter of 22 mm) with 5 ml of nutrient medium.

After a 3-week period of cultivation on the respective nutrient medium the number of newly formed shoots higher than 5 mm (multiplication rate-Km) and average height of the shootlets (mm) were reported.

Rooting

Микрорастенията са вкоренявани на хранителни среди MS с намалена наполовина концентрация на макроелементи, 1 μM IBA и 20g/l захароза.

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

Растенията са адаптирани в саксийки с торфено-перлитна смес, поставени във влажни камери, при температура $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ и фотопериод 16 часа ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD).

За всеки вариант хранителна среда са залагани по 30 растения. Експериментът е проведен трикратно.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При всички варианти на стерилизация са получени 85%-100% стерилни експланти. Най-подходящо е 5 минутно третиране с калциев хипохлорит за връхчетата и 7 мин. – за стъблени сегменти. При тези третираня се осигурява над 85% степен на обеззаразяване, експлантите са свежи, зелени и жизнени и имат висока степен на адаптация към *in vitro* условия.

Резултатите от изпитването на хранителни среди за мултипликация на черешовата подложка Gisela 6 са

The microplants were rooted on nutrient medium MS with half-strength macroelements, 1 μM IBA and 20 g/l sucrose.

All the *in vitro* plants were cultivated in a growth chamber at a temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ and 16/8 hour photoperiod ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD).

Adaptation

Adaptation of plants was carried out in pots with peat-perlite mixture put in humid chambers at a temperature of $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ and a photoperiod of 16 hours ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD).

For each variant of nutrient media 30 shoots in three repetitions were set.

RESULTS AND DISCUSSION

In all the variants of sterilization 85% – 100% of sterile explants were obtained.

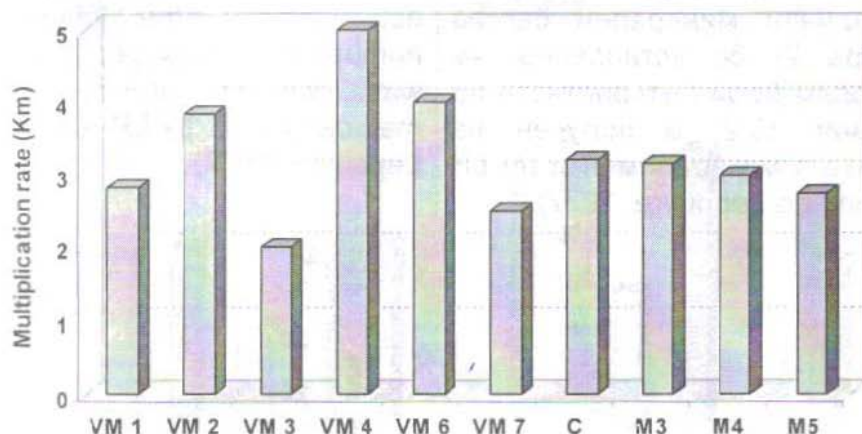
The most suitable proved to be the 5-minute treatment with calcium hypochlorite for the tips and 7-minute treatment for the shoot segments.

In those over 85% disinfection was obtained and the explants were fresh, green and vital, displaying a high level of adaptation to *in vitro* conditions.

The results of testing the variants in nutrient media for multiplication of the sweet cherry rootstock Gisela 6 were presented

представени на фигура 1.

in Figure 1.



Фиг. 1. Влияние на състава на хранителните среди върху коефициента на мултипликация (Km) при черешовата подложка Gisela 6 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*)

Fig. 1. Effect of nutrient media on the multiplication rate (Km) of cherry rootstock Gisela 6

Растенията от всички варианти са свежи, зелени, без покафевяване на връхчета или листа. Не е установено встъкляване.

Най-висок коефициент на мултипликация е постигнат на хранителни среди VM4 (MS соли, 2.5 μM BAP, 0.005 μM IBA, захароза 15g/l и сорбитол 15g/l) и VM6 (MS соли, 2.5 μM BAP, 0.057 μM IAA, захароза 15g/l и сорбитол 15g/l).

Проучено е влиянието на отделните фактори – вид и концентрация на макроелементи в хранителната среда, вид и концентрация на цитокинини, ауксини и въглехидрати, върху коефициента на мултипликация и височината на *in vitro* растенията.

The plants in all the variants were fresh, green, without developing brown tips or leaves.

Vitrification was not established.

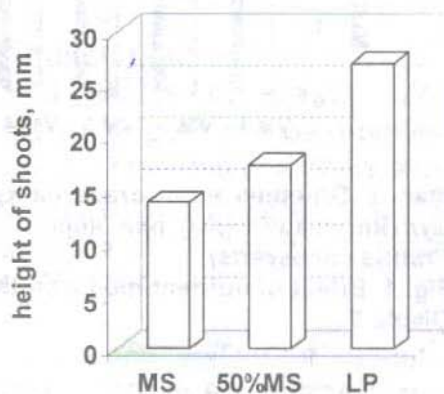
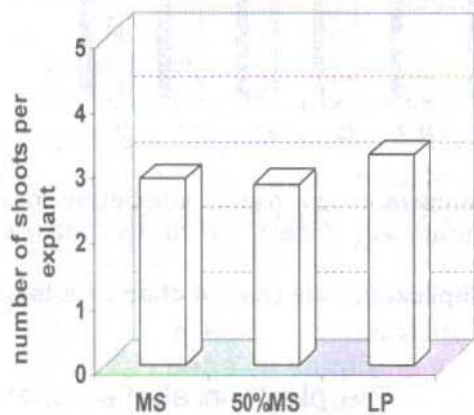
The best results were obtained on nutrient media VM4 (MS salts, 2.5 μM BAP, 0.005 μM IBA, sucrose 15g/l and sorbitol 15 g/l) and VM6 (MS salts, 2.5 μM BAP, 0.057 μM IAA, sucrose 15 g/l and sorbitol 15g/l).

The effect of several factors was studied – the type and the concentration of macroelements in the nutrient medium, the type and the concentration of cytokinins, auxins and carbohydrates.

When comparing the variants

При сравняване на варианти, култивирани на среди с различен минерален състав (фигура 2) бе установено, че най-голям брой леторастчета на растение (3.2) е получен на средите с макроелементи по LP (Quorin and Lepouvre, 1977).

cultivated on media of different mineral content (Figure 2), it was established that the highest mean number of shoots per plant (3.2) was obtained on media with macroelements by LP (Quorin and Lepouvre, 1977).



A/A

B/B

Фиг. 2. Влияние на минералния състав на хранителната среда върху коефициента на мултипликация – Км (А) и височината на растенията (В) при черешовата подложка Gisela 6

Fig. 2. Effect of macroelements in the nutrient media on the multiplication rate – Км (A) and height of shoots (B) of cherry rootstock Gisela 6

Същата среда стимулира най-силно и нарастването на растенията на височина.

Влиянието на изпитваните концентрации на цитокинина ВАР върху коефициента на мултипликация не е ясно изразено (фигура 3А). В същото време средната височина на новоформираните леторастчета на среди с по-високо съдържание на ВАР е по-голяма (фигура 3Б). Това улеснява и ускорява

The same medium also stimulated most strongly the plant growth in height.

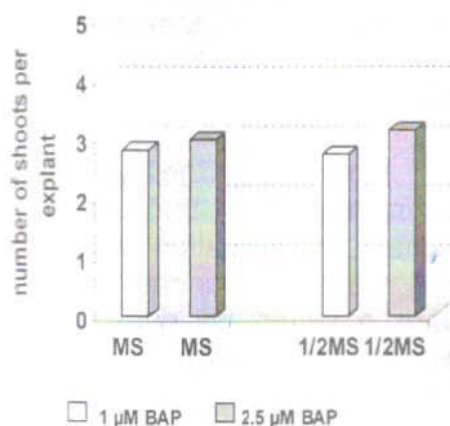
The effect of the studied concentrations of the cytokinin BAP on the multiplication rate was not obviously expressed (Figure 3A).

At the same time the average height of the newly formed shoots on media with a higher BAP content was bigger (Figure 3B).

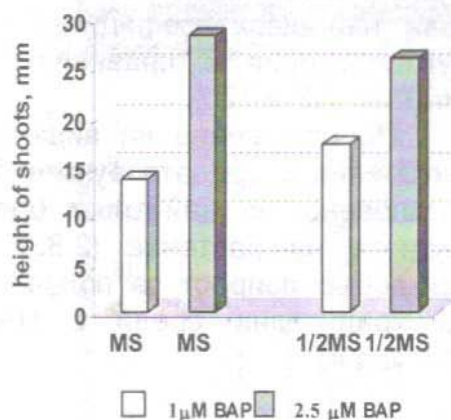
That made the process of

процеса на микроразмножаване и прави тези среди по-подходящи за приложение.

micropropagation easier and quicker and those media – more suitable.



A/A



B/B

Фиг. 3. Влияние на концентрацията на цитокинина BAP върху коефициента на мултипликация – Км (А) и височината на растенията (В) при черешовата подложка Gisela 6

Fig. 3. Effect of concentration of cytokinin BAP on the multiplication rate – Км (A) and height of shoots (B) of cherry rootstock Gisela 6

Цитокининът BAP намира широко приложение при *in vitro* култивирането на череша. Dziedzic and Malodobry (2004) използват хранителна среда по MS, обогатена с 0.5 mg/l BAP и 0.1 mg/l IBA при микроразмножаване на черешовите подложки Гизела5 (Gisela), Weiroot 10, Damil, Edabriz, Maxma и PHL 84. Muna et al. (1999) съобщават за висок коефициент на мултипликация (Murashige and Skoog, 1962) при подложката Maxma 14, култивирана на MS хранителна среда с 4.44 μM BAP и 0.49 μM NAA. При изследване влиянието

The cytokinin BAP has found wide application in sweet cherry *in vitro* cultivation.

Dziedzic and Malodobry (2004) used MS nutrient medium enriched with 0.5 mg/l BAP and 0.1 mg/l IBA in micropropagation of the sweet cherry rootstocks Gisela 5, Weiroot 10, Damil, Edabriz, Maxma and PHL 84.

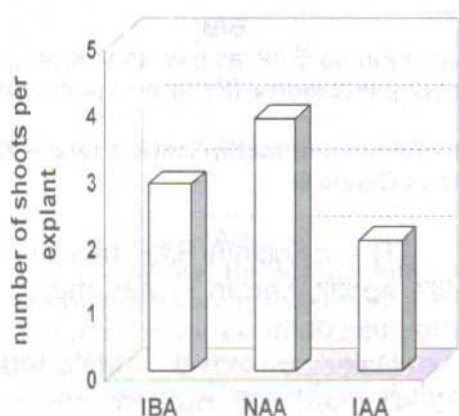
Muna et al. (1999) reported about a high coefficient of multiplication (Murashige and Skoog, 1962) for Maxma 14 rootstock cultivated on MS nutrient medium with 4.44 μM BAP and 0.49 μM NAA. When studying the effect of cytokinins on the

на цитокинините върху ин витро размножаването на черешовия сорт Лапинс, Ruzic and Vujovic (2008) установяват, че BAP ($5\mu\text{M}$) в комбинация с $0,5\mu\text{M}$ IBA дава най-висок коефициент на мултипликация в сравнение с кинетин, 2iP и TDZ.

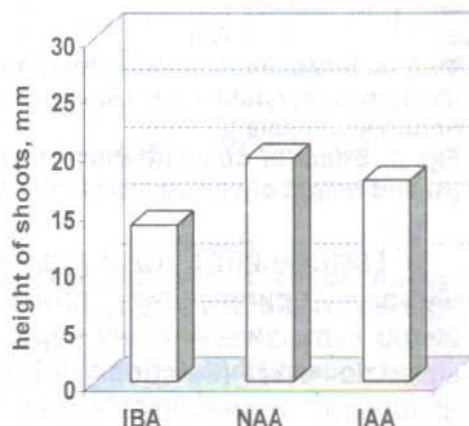
По отношение на вида на включения в средата ауксин бе установено, че най-голям брой шутчета на растение (2.83) и най-добър прираст са получени на хранителни среди с NAA (фигура 4).

multiplication rate of the sweet cherry cultivar Lapins, Ruzic and Vujovic (2008) established that BAP ($5\mu\text{M}$) in combination with $0,5\mu\text{M}$ of IBA gave the highest multiplication coefficient in comparison with kinetin, 2iP and TDZ.

Concerning the type of the auxin included in the medium the highest multiplication rate (2.83) and the biggest increment length were obtained on nutrient media with NAA (Figure 4).



A/A



B/B

Фиг. 4. Влияние на типа на ауксина върху коефициента на мултипликация – Км (А) и височината на растенията (В) при черешовата подложка Gisela 6
 Fig. 4. Effect of the type of the auxin on the multiplication rate – Км (A) and height of shoots (B) of cherry rootstock Gisela 6

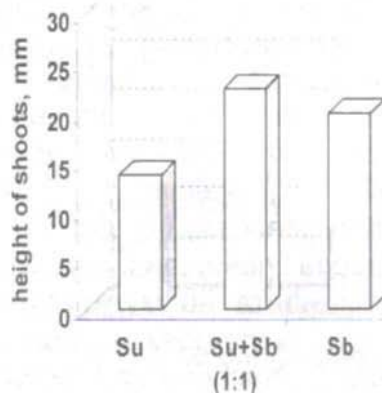
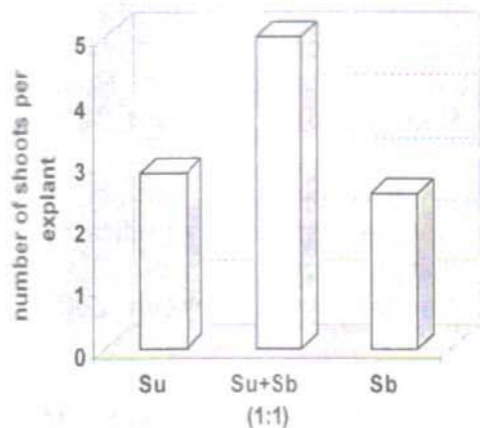
Видът и концентрацията на включените в хранителната среда въглехидрати силно повлияват развитието на Gisela 6 *ин витро*. Използуване на комбинация от сорбитол и

The type and the concentration of the carbohydrates included in the nutrient media had a proven effect on the development of Gisela 6 plants. The use of the combination of

захароза води до почти двойно нарастване на коефициента на мултипликация. Растенията са в отлично физиологично състояние, а новообразуваните стъбла достигат 22.5 mm (фигура 5).

sorbitol and sucrose caused a double increase of the multiplication rate up.

The plants were of an excellent physiological status and the newly formed stem reached up to 22.5 mm (Figure 5).



A/A

B/B

Фиг. 5. Влияние на типа на въглехидратния източник върху коефициента на мултипликация – Км (А) и височината на растенията (В) при черешовата подложка Gisela 6

Fig. 5. Effect of the type of the carbohydrate supply on the multiplication rate – Км (А) and height of shoots (В) of cherry rootstock Gisela 6

Получените данни от експериментите за микроразмножаване на подложката за череша Гизела 6 показват изключителното значение на вида и концентрацията на включените в хранителните среди въглехидрати, и в частност на сорбитола. Той има стимулиращ ефект върху коефициента на мултипликация и нарастването на новоформираните растения. В последните години на този проблем в научната литература

Data obtained from the micropropagation experiments of the sweet cherry rootstock Gisela 6 showed the great importance of the type and the concentration of the carbohydrates, especially of sorbitol, included in the nutrient media.

It had a proven effect on the multiplication rate and on the growth of the newly formed plants. In the recent years special attention has been paid to that problem in scientific literature

се обръща все по-голямо внимание (Marino et al., 1993; Kadota et al., 2001). Изследванията при видовете от род *Malus* и *Prunus* показват изключителното значение на включването на сорбитол в хранителните среди. Сорбитолът наред със захарозата е първичен продукт на фотосинтезата и основна транспортна форма на въглерода при дървесните видове от *Rosaceae* (Bieleski, 1982, Wallaart, 1980). Комбинирането на сорбитол и захароза повишава значително коефициента на мултипликация и при черешовата подложка Gisela 5 (Nacheva and Gercheva, 2007).

Микрорастенията са вкоренявани на хранителна среда, показала най-добри резултати при нашите експерименти за вкореняване на подложката Gisela 5 (Nacheva and Gercheva, 2006). Тя се оказва много подходяща и за Gisela 6 – вкорениха се над 80% от заложените растения. Същите са адаптирани успешно и подготвени за засаждане в питомник.

ИЗВОДИ

Най-добри резултати при микроразмножаване на черешовата подложка Gisela 6 са получени на хранителни среди VM4 (MS соли, 2.5 μ M BAP, 0.005 μ M IBA, захароза

(Marino et al., 1993; Kadota et al., 2001). Studies on species of *Malus* and *Prunus* genus showed the great importance of adding sorbitol to the nutrient media.

Sorbitol together with sucrose is a primary product of photosynthesis and the major transport form of carbohydrates in the tree species of *Rosaceae* (Bieleski, 1982; Wallaart, 1980).

Combining sorbitol and sucrose increased significantly the multiplication rate of Gisela 5 (Nacheva and Gercheva, 2007).

The microplants were rooted on nutrient medium, which showed the best results in our experiments for rooting of rootstock Gisela 5 (Nacheva and Gercheva, 2006).

It proved to be very suitable for Gisela 6 too – over 80% of the plants set roots.

They were successfully acclimatized and prepared for planting in a nursery.

CONCLUSIONS

The best results for micropropagation of the sweet cherry rootstock Gisela 6 were obtained on nutrient media VM4 (MS salts, 2.5 μ M BAP, 0.005 μ M IBA, sucrose 15g/l and sorbitol 15

15g/l и сорбитол 15g/l) и VM6 (MS соли, 2.5 μ M BAP, 0.057 μ M IAA, захароза 15g/l и сорбитол 15g/l).

В резултат от проведените експерименти са въведени в култура, размножени *in vitro* и съхранени в генбанка растения от черешовата подложка Gisela 6 (*Prunus cerasus* X *Prunus canescens*), които ще се използват за бъдещи изследвания и полски опити.

Благодарности

Настоящата разработка представя част от резултатите, получени в изпълнение на проект BM-36/2005, финансиран от фонд „Научни изследвания“ МОН.

g/l) and VM6 (MS salts, 2.5 μ M BAP, 0.057 μ M IAA, sucrose 15 g/l and sorbitol 15g/l).

As a result of the experiments carried out, plants of the sweet cherry rootstock Gisela 6 were established in culture, *in vitro* propagated and stored in a genebank to be used for further studies and field experiments.

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. **Bialeski R. L.**, 1982. Sugar alcohols. In: Encyclopedia of Plant Physiology, new series, vol 13A, Springer Verlag, Berlin. pp: 158-192.
2. **Dziedzic E., Malodobry M.**, 2004. Micropropagation of sweet cherry rootstocks. Biotechnologia 2: 206-211
3. **Kadota M., Imizu K., Hirano T.**, 2001. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. Scientia horticulturae. 89, (3):207-215.
4. **Marino G., Bertazza G., Magnanini E., Altan A. D.**, 1993. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34:235-244.
5. **Muna A-S., Ahmad A-K., Mahmoud K., Abdul-Rahman K.**, 1999. *In vitro* propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock. Plant Cell, Tiss. And Org. Cult., 59 (3): 203-208.
6. **Murashige T., F.Skoog.**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum15, 473-497.
7. **Nacheva L., P. Gercheva**, 2006. The effect of auxin type and concentration on *in vitro* rooting of Gisela 5 (Cherry dwarf rootstock). Journal of Mountain Agriculture on the Balkans 9, 7, 1309-1316.
8. **Nacheva L., P. Gercheva**, 2007. Micropropagation of Gisela 5 (Cherry dwarf rootstock): The effect of the type and the concentration of the carbohydrates in the nutrient medium. First Balkan Symposium on Fruit Growing 15-17 November 2007, Plovdiv, Bulgaria.
9. **Quorin M., P. Lepouvre**, 1977. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus*. sp. Acta Horticulturae, 78, 437-442.

10. **Ruzic D., Vujovic T.,** 2008. The effect of cytokinin types and their concentration on in vitro multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.) Hort. Sci. (Prague), 35(1):12-21.

11. **Wallaart R. A.,** 1980. Distribution of sorbitol in Rosaceae. Phytochemistry 19, 2603-2610.