

## ВЛИЯНИЕ НА ГАЗОПРОНИЦАЕМО ПОКРИТИЕ НА КУЛТУРАЛНИТЕ СЪДОВЕ ВЪРХУ РАСТЕЖА НА *in vitro* КУЛТИВИРАНИ ОВОЩНИ РАСТЕНИЯ

Лиляна Начева, Кръстина Иванова  
Институт по овощарство, Пловдив

### *Influence of the Gas-Permeable Closure of the Vessels on the Growth of in vitro Cultured Fruit Plants*

L. Nacheva, Kr. Ivanova  
Fruit Growing Research Institute, Plovdiv, Bulgaria

#### **Abstract**

The aim of the present research is to study the effects of the improved gas exchange of the vessels on the growth of *in vitro* cultivated apple rootstock MM106.

The data of the investigation show that plantlets cultured in vessels with gas-permeable closure accumulate more of dry matter and more light-harvesting pigments than this cultured in tightly closed jars. This precultivation of plants in the rooting stage might help the successful acclimatization of the plants to the *ex vitro* conditions.

**Key words:** micropropagation, dry matter, light-harvesting pigments, rooting, apple rootstock MM106

През последните четиридесет години *in vitro* размножаването на растения се разви от лабораторен куриоз до световна индустрия. Понастоящем то се прилага широко в селското и горското стопанство в целия свят - повече от 300 милиона растения се произвеждат чрез микро-размножаване всяка година.

По време на *in vitro* култивирането микрорастенията са поставени при специални условия (висока влажност, ниска интензивност на светлината, екзогенните въглехидрати). Това води до формиране на растения с аномална морфология, анатомия и физиология и тези растения

трудно преодоляват стреса в процеса на адаптация към условията на външната среда. Приносът на фотосинтезата към цялостния въглероден метаболизъм на *in vitro* култивираните растения е широко дискутиран проблем. Съвременните изследвания показват, че слабата фотосинтеза на растенията *in vitro* се дължи главно на споменатите по-горе условия в културалните съдове. В научната общност все по-широко се налага мнението, че фотосинтетичната компетентност на растенията *in vitro* може да бъде важен фактор, определящ преживяемостта им в процеса на аклиматизация към външните условия.



Целта на проведения експеримент беше да се изследва влиянието на газопроницаемо покритие на културалните съдове върху растежните и морфогенетични процеси, както и върху съдържанието на фотосинтетични пигменти при вкореняване на *in vitro* растения от ябълковата подложка MM106.

### Материал и методи

*In vitro* културата от ябълковата подложка MM 106 се поддържа чрез 3 седмично субкултуриране на основна MS (Murashige and Skoog, 1962) хранителна среда, обогатена растежни регулатори ( $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  BAP,  $0,01 \text{ mg l}^{-1}$  IAA), захароза  $30 \text{ g l}^{-1}$ , агар  $7 \text{ g l}^{-1}$ .

Вкореняването на растенията (връхчета с размери 1-1,5 cm) става на хранителна среда с намалена солева концентрация на макроелементите (25% MS), микроелементи MS, витамини MS, захароза  $15 \text{ g l}^{-1}$  и IBA  $0,3 \text{ mg l}^{-1}$ .

Използвани са стъклени буркани с вместимост 600 ml, снабдени със стъклени капаци. Напречното сечение на бурканите има площ  $78,5 \text{ cm}^2$ . Във всеки буркан на среда от 100 ml се залагат по 30 експланта. За избягване на вторична инфекция ръбът на буркана и капака се обвиват с прозрачно полиетиленово фолио.

Растенията се отглеждат в камера с температура  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  и фотопериод 16 часа ( $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ФАР).

В представения експеримент са изследвани 2 типа на затваряне на културалните съдове:

- конвенционален (контрола) – със стъклен капак и фолио, който осигурява газообмен със скорост 0,013 обема на час (Nacheva and Ivanova, 1998);

- затваряне, при което между ръбовете на съда и капака се поставя полиестерна вата под формата на сегмент. В този случай скоростта на газообмена достига до 3,6 обема/час (Nacheva and Ivanova, 1998), като същевременно се запазва стерилността на културата.

На 15-ия и 21-ия ден са анализирани съдържанието на свежа (FW) и суха био-

маса (DW) на растенията и отделните ботанически органи в един буркан. Изследвани са по 10 буркана от всеки вариант.

Фотосинтетичните пигменти са определяни спектрофотометрично в 80% ацетон екстракт. За всеки вариант са правени по 3 успоредни проби. Количеството на отделните пигменти се изчислява от уравненията на Lichtenthaler and Wellburn (1983).

При сравняване на двата варианта е използван *t*-тест за определяне на LSD.

### Резултати и обсъждане

Коренообразуването в *in vitro* условия в същността си е адвентивен органообразователен процес, който протича в няколко обособени етапа. Първият етап е индукция под влиянието на присъстващ в хранителната среда ауксин. Вторият етап е появата на ризогенен калус, от който към 12-15-ия ден се развиват адвентивни коренчета. Между 15-ия и 20-ия ден следва ускорено нарастване на корените. И при двата анализирани варианта е отчетен висок процент на вкореняване – над 92%, като няма доказана разлика между тях.

Прирастът на общата суха маса на *in vitro* растенията, култивирани при плътно затваряне на културалните съдове (контролата), е съществено по-малък от варианта с газопроницаемо покритие (фиг.1а). Разликата е сравнително помалка на 15-ия ден - около 60 mg, но на 21-ия ден достига до над 100 mg, което означава, че под влияние на подобрения газообмен се стимулира синтезът на органична материя. Тези резултати са в унисон с установения от редица автори побърз растежа на микрорастения от различни видове при обогатяване с  $\text{CO}_2$ . (Kozai and Iwanami, 1988; Infante et al., 1989; Solarova et al., 1989; Laforge et al., 1990; Cournac et al., 1991; Kozai et al., 1991; Figueira et al., 1992; Kubota and Kozai, 1992; Deng and Donnelly, 1993; Buddendorf-Joosten and Woltering, 1994).

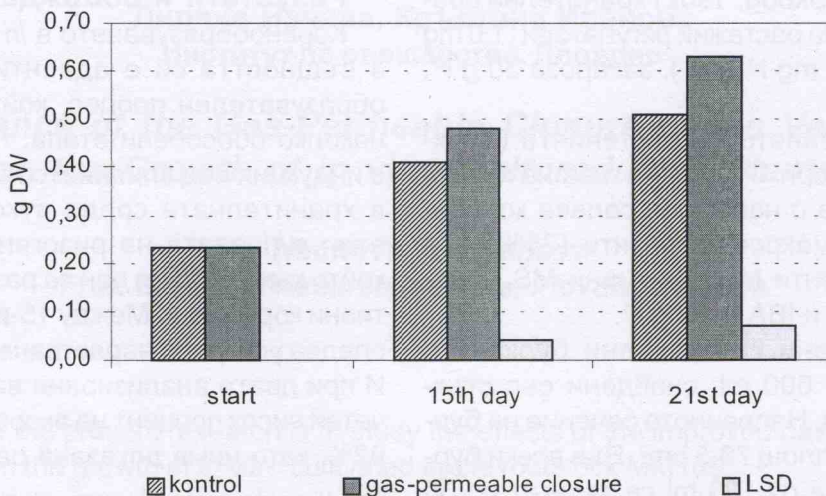
Под влияние на подобрената вентилация прирастът на сухата маса на листа-



та се повишава, подобно на общия прираст, но разликите спрямо контролата са по-големи (фиг. 1b). Прирастът на стъблата се ограничава до появата на коренчетата – 12-15-ия ден, а след това намалява, паралелно с нарасналия темп на растеж на корените (фиг 1c и 1d). На този фон изпъква и влиянието на газопроницаемостта покритие – при този вариант коренчетата се появяват по-рано и на 15-ия ден тяхната биомаса е вече по-голяма в сравнение с контролния вариант. В същия срок на анализ сухата маса на стъблата

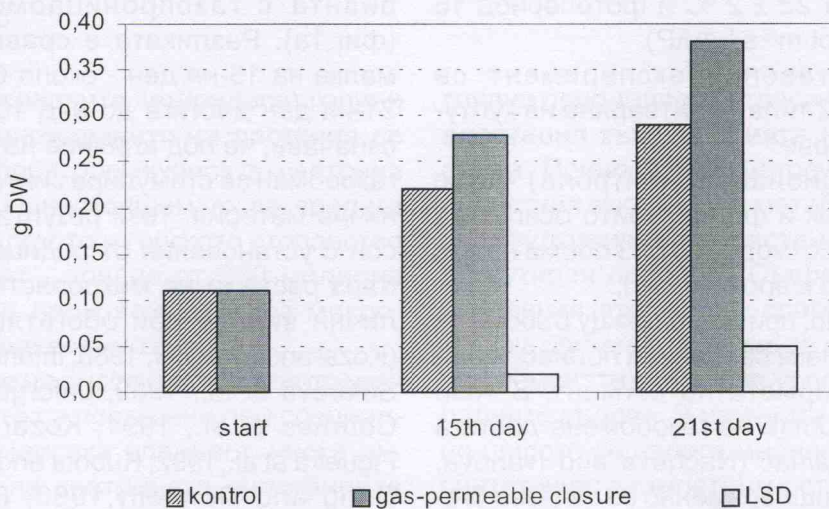
на микрорастенията, култивирани с полиестерна вата, е намаляла (макар и малко) в сравнение с контролата. Тези разлики са значително по-силно изразени в периода между 15-ия и 21-ия ден, т. е. по време на активния растеж на коренчетата.

При оптимизиране на вентилацията на културалните съдове се повишава и процентът на сухата маса спрямо единица свежа. Разликата спрямо контролата обаче е доказана само за общата суха биомаса, докато за отделните ботанически органи се проявява като тенденция (табл. 1).



Фиг. 1а. Обща суха биомаса, g

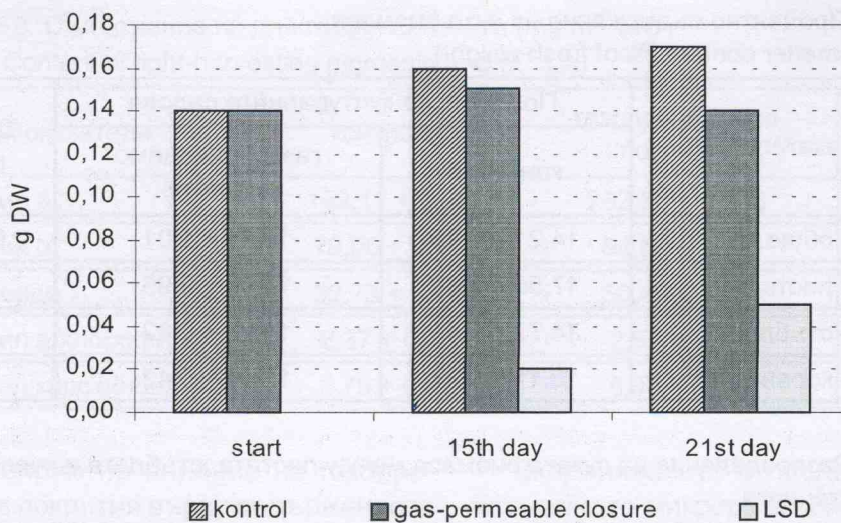
Fig. 1a. Total dry weight (DW) of the plantlets in the vessel



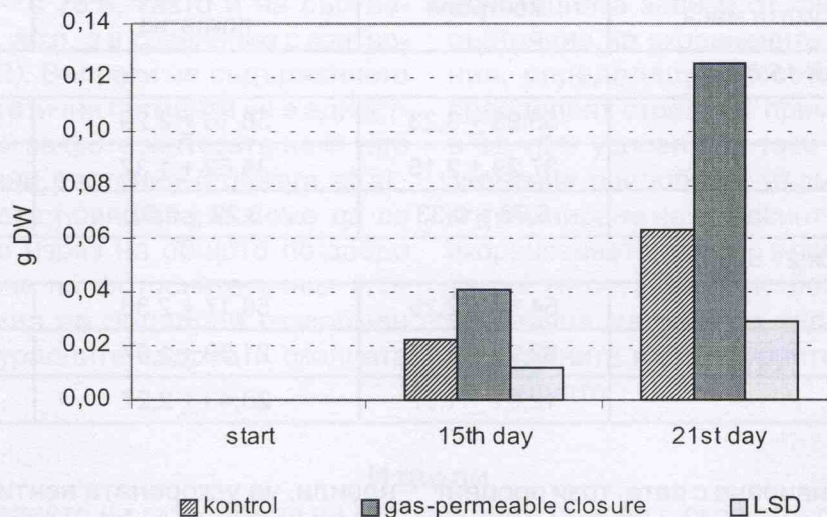
Фиг. 1в. Суха маса на листата, g

Fig. 1b. Dry weight of the leaves





Фиг. 1с. Суха маса от стебла, g  
Fig. 1c. Dry weight of the stems



Фиг. 1 d. Суха маса от корени, g  
Fig. 1d. Dry weight of the roots

Отбелязаните особености в прираста на суха биомаса на отделните ботанически органи се отразяват и върху техният относителен дял спрямо общата биомаса на микрорастенията (табл. 2). На 15-ия ден от началото на култивирането относителният дял на листата (на база суха маса) спрямо целите растения не се различава съществено при двата типа на затваряне – 55,93% за контролата и 56,16% - за другия вариант. На 21-ия ден е налице ясно изразено повишение в дяла на листата при растенията, култивирани

с газопроницаемо покритие – 58,17% срещу 54,84% при контролния вариант (табл. 2).

Относителният дял на стъблата при 15-дневно култивиране е с близки стойности при двата варианта. След още 6 дни (пасаж 21 дни вече е налице понижаване дяла на стъблата за сметка на увеличаване процента листа и най-вече на нарасналите корени. На 15-ия ден корените на микрорастенията, отглеждани по конвенционална технология, представляват 6,78% от сухата маса на растенията, до-



Таблица 1. Процентно съдържание на суха биомаса  
Table 1. Dry matter content (% of fresh weight)

Показатели	Покритие на културалните съдове		Доказана разлика
	контрола	газопроницаемо покритие	
Суха маса – общо, %	14,21 ± 0,93	16,71 ± 1,01	P = 0,05
Суха маса – листа, %	17,58 ± 1,32	18,98 ± 0,95	NS
Суха маса – стъбла, %	14,72 ± 1,41	14,95 ± 0,82	NS
Суха маса – корени, %	10,11 ± 0,87	11,36 ± 0,43	NS

Таблица 2. Разпределение на сухата биомаса между листата, стъблата и корените на микрорастенията

Table 2. The distribution of dry matter between the leaves, stems and roots of the plantlets

Относителен дял на ботанически органи, % от сухата маса	Покритие на културалните съдове		Доказана разлика
	контрола	газопроницаемо покритие	
<i>А) при пасаж 15 дни:</i>			
Листа	55,93 ± 3,23	56,16 ± 2,29	NS
Стъбла	37,29 ± 2,15	35,62 ± 1,32	NS
Корени	6,78 ± 0,33	8,22 ± 0,52	P = 0,05
<i>Б) при пасаж 21 дни:</i>			
Листа	54,84 ± 2,25	58,17 ± 2,36	P = 0,05
Стъбла	32,26 ± 2,17	21,39 ± 1,87	P = 0,001
Корени	12,91 ± 1,07	20,43 ± 2,27	P = 0,001

като при култивиране с вата, този процент е 8,22. Разликата между двата варианта се вижда още по-ясно след период от 21 дни, при който корените на микрорастенията, култивирани с проницаемо покритие, представляват 20,4% от общата биомаса, а при растенията от плътно затворените съдове – само 12,9%. При условията на подобрен газообмен на културалните съдове с околната среда, благоприятстващи фотомиксотрофен тип на хранене, микрорастенията развиват по-голяма асимилираща повърхност, което е предпоставка за по-добър растеж на корените и на целите растения.

Получените от нас експериментални резултати не са в унисон с данните на Walker и съавт. (1988), които са уста-

новили, че ускорената вентилация не повишава темпа на растеж на хризантема в етап на мултипликация. Същевременно те съвпадат с изследванията на Kubota и Kozai (1992), които съобщават за чувствително стимулиране на растежа на Solanum. Аналогични са и резултатите с гербера и Ficus lirata, публикувани от Jackson и др. (1991), както и данните на Sologova (1996) за карамфил и картофи при неплътено затваряне на съдовете. Тези ефекти авторите обясняват както с ускорения достъп на CO<sub>2</sub> в културалните съдове по време на светлинния период, така и с избягване на натрупването на етилен и токсични концентрации на CO<sub>2</sub> в края на периода на тъмно.

В процеса на вкореняване е регистри-



Таблица 3. Съдържание на пластидни пигменти (mg m<sup>-2</sup> LA)

Table 3. Content of light-harvesting pigments (mg m<sup>-2</sup> LA)

Показатели	контрола	газопроницаемо покритие	Доказана разлика
Хлорофил а	189,17 ± 8,92	252,56 ± 18,53	P = 0,01
Хлорофил b	79,96 ± 0,45	94,58 ± 7,38	P = 0,01
Каротиноиди	39,73 ± 3,17	50,45 ± 2,34	P = 0,01
Хлорофил а/хлорофил b	2,37 ± 0,11	2,67 ± 0,12	P = 0,05
Хлорофил/каротиноиди	6,79 ± 0,37	6,88 ± 0,38	NS

рано благоприятно влияние на газопроницаемите покрития върху съдържанието на пластидни пигменти. Наблюдава се повишаване в съдържанието на хлорофил а с 33%, на хлорофил b – със 17,5% и на каротиноиди – с 26%, както и на съотношението хл. а/хл. b в сравнение с контролата (табл. 3). Въпреки че съдържанието на фотосинтетични пигменти не е единствен критерий за фотосинтезата на *in vitro* размножавани растения (Fujiwara et al., 1992), тяхното повишаване може да се приеме като израз на общото по-добро структуриране на фотосинтетичния апарат в условия на подобрен газообмен между културалните съдове и околната среда.

Вкореняването е последният етап от клоналното микроразмножаване в *in vitro* условия, предшестваш изнасянето на микрорастенията за адаптация към външните условия. До голяма степен успехът на адаптацията зависи от физиологичното състояние на вкоренените *in vitro* растения, определящо способността им да преодолеят стреса от преместването им в *ex vitro* условия. В този аспект важно значение придобиват възможностите за оптимизиране на фотосинтезата още при вкореняването, защото в процеса на адаптация тя остава единствен източник на органична материя за задоволяване на енергийните и структурните потребности растенията.

### Изводи

Подобряването на газообмена на културалните съдове с околната среда при вкореняването на *in vitro* размножавана ябълкова подложка MM 106 се отразява положително върху цялостното структуриране на фотосинтетичния апарат. При използването като газопроницаемо покритие полиестерна вата под стъкления капак, осигуряващо скорост на газообмена от порядъка на 2,7 до 3,6 обема/час, се увеличават прирастът на суха биомаса и листната площ, а също съдържанието на фотосинтетични пигменти. Повишеният фотосинтетичен капацитет на растенията в процеса на вкореняване е предпоставка за по-успешна аклиматизация към външните условия.

### Литература

- Buddendorf - Joosten, J. and Woltering, E. 1994. *Plant Growth Regul.*, 15: 1-5
- Cournac, L., Dimon, B., Carrier, P. Lohou, A. and Chagvardieff, P. 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* under different conditions of aeration, sucrose supply, and CO<sub>2</sub> enrichment. *Plant Physiol.*, 97: 112-117
- Deng, R., and Donnelly, D. J. 1993. *In vitro* hardening of red raspberry through CO<sub>2</sub> enrichment and RH reduction on sugar-free medium. *Can. J. Plant Sci.*, 73: 1105
- Fujiwara, K., Kira, S. and Kozai, T. 1992. Time course of CO<sub>2</sub> exchange of potato cultures

*in vitro* with different sucrose concentration in the culture medium. *J. Agr. Met.*, 48: 49-56

**Infante, R., Magnanini, E. and Righetti, B.** 1989. The role of light and CO<sub>2</sub> in optimising the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa in vitro*. *Physiol. Plant.*, 77: 191-195.

**Jackson, M., Abbott, A., Belcher, A., Hall, K., Butler, R. and Cameron, J.** 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and CO<sub>2</sub> accumulation, oxygen depletion and explant development. *Ann. Bot.*, 67: 229-237

**Kubota, C. and Kozai, T.** 1992. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced and natural ventilation. *Hort Sci.*, 27: 1312 - 1314

**Lichtenthaler, H. and Wellburn, A.** 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different sol-

vents. *Biochem. Soc. Trans.*, 603: 591-592

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

**Nacheva, L. and Ivanova, K.** 1998. Effects of the gas exchange rate in the culture vessels on the photosynthesis and the carbon metabolism of micropropagated fruit plantlets (apple rootstock MM 106). *Biotech. & Biotechnol. Eq.*, 12 (1): 39-44

**Solarova, J.** 1989. Photosynthesis of plant regenerant. Diurnal variation in CO<sub>2</sub> concentration in cultivation vessels resulting from plantlets photosynthetic activity. *Photosynthetica*, 23: 100-107.

**Walker, P., Heuser, C., and Heinemann, P.** 1988. Micropropagation: Studies of gaseous environment. *Acta Hortic.*, 230: 145-151