

<p>Stockbreeding H. Stancheva, J. Nakov, G. Staikova Quality characteristics of the carcass and physico-chemical composition of the meat of lambs of the Bulgarian Dairy Synthetic Population (BDSF) and its F₁ crosses with chine and japonica 639-649</p>	<p>Животновъдство H. Станчева, Ж. Накъв, Г. Стайкова Качествени характеристики на типул и физико-химичен състав на месо от овцете от Синтетична Популация Българска Млячна и Нейна F₁ кръстоски с породите Хино и Япон 639-649</p>
<p>JOURNAL Te. Mashev Composition of fat in milk of sheep of the Central Balkan Mountains 644-658</p>	<p>Г. Топчев, Т. Михайлова, Ц. Мачев Масно състав на млякото от овецете от Централния Балкански планински овал 644-658</p>
<p>Volume 14 Number 4, 2011 Population Bulgarian Milk 656-666</p>	<p>E. Panchova, T. Natcheva Предварително проучване върху някои параметри свързани с млякото от овцете от Синтетична Популация Българска Млячна 656-666</p>
<p>Published by Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture Troyan, Bulgaria 667-677</p>	<p>И. Христова, Д. Теофанова, N. Механджийска, А. Носева, Т. Радославова Генетична изменчивост от гледна точка за качеството на формата на калпа каземовата 667-677</p>

ВКОРЕНЯВАНЕ НА *IN VITRO* ПОЛУЧЕНИ МИКРОРЕЗНИЦИ ОТ *MAGNOLIA GRANDIFLORA*, L. И *MAGNOLIA. X SOULANGIANA*, SOUL.-BOD.

О. Ибрахим¹, П. Герчева², Л. Начева², В. Иванова³

¹Отдел Градинарство, Аграрен Факултет, Университет Асиут, Асиут, Египет

²Институт по овощарство – Пловдив, България

³Факултет по лозарство и градинарство, Аграрен Университет - Пловдив

ROOTING OF *IN VITRO*-RAISED MICROCUTTINGS OF *MAGNOLIA* *GRANDIFLORA*, L. AND *M. X SOULANGIANA*, SOUL.-BOD.

O. Ibrahim¹, P. Gercheva², L. Nacheva², V. Ivanova³

¹Horticulture Dept., Fac. Agriculture, Assiut University, Assiut, Egypt

²Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria

³Faculty of Viticulture and Horticulture, Agricultural Univ., Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Освен с голяма декоративна стойност, видовете *Magnolia grandiflora* и *M. x soulangiana* са известни с ценната си дървесина и с приложение в медицината. Установено е, че вкореняването е основният проблем при тяхното *in vitro* култивиране. Целта на настоящото проучване е да се изследват възможностите за вкореняване на *in vitro* растения от двата вида. Използвани са хранителни среди с различни концентрации на IBA - 0.0, 2.46, 4.92, 24.60 μM . Наред с тези варианти, връхчета от *M. grandiflora* са третирани по различни начини: А. с вариращо съдържание на ауксини (1.5 μM IBA, 1.5 μM IBA + 1.14 μM IAA или 1.5 μM IBA + 2.85 μM IAA); В. хранителни среди (твърди агарови среди или течни среди с перлит като поддържащ материал) и С. условия на култивиране (фотопериод 16 часа светло/8 часа тъмно или 10 дни тъмно и след това при споменатия фотопериод).

SUMMARY

Magnolia grandiflora and *M. x soulangiana* are species with high aesthetic importance in addition to the medicinal and timber values of the former. Rooting *in vitro* is considered the main problem in the development of microculture of both species.

The aim of the present study was to investigate the rooting ability of elongated *in vitro* shoots of both species. Rooting media supplemented with different concentrations of IBA - 0.0, 2.46, 4.92, 24.60 μM were used in the study.

Shoots of *M. grandiflora* were further subjected to different treatments concerning: A. auxin level (1.5 μM IBA, 1.5 μM IBA + 1.14 μM IAA and 1.5 μM IBA + 2.85 μM IAA); B. medium type (agar-based solid or perlite-based liquid medium) and C. growing condition (dark during the first 10 days or light 16-h photoperiod). *In vitro* rooting wasn't feasible in all cases.

Вкореняване *in vitro* не е отчетено при нито един от изследваните варианти. Всички растения – вкоренени и некоренени, са заложени в торфено-перлитен субстрат *ex vitro*. След 60 дни е отчетен забележително висок процент на вкореняване и адаптация *ex vitro* – до 100% при варианта с 1.48 μ M IBA + 1.14 μ M IAA в агаровата хранителна среда (*in vitro*) при светлинен режим 16/8 часа светло/тъмно, следвано от същия вариант, но на течна хранителна среда с перлит (90%).

Ключови думи: *Magnolia grandiflora*, *M. x soulangiana*, *in vitro*, вкореняване, IBA, IAA, перлит

УВОД

Едроцветната магнолия (*Magnolia grandiflora*) е най-отглежданото от всички вечнозелени орнаментални дървета в света. Известно е със своята ценна дървесина и като източник на различни екстракти с потенциални приложения във фармацията (Tresender, 1978). *Magnolia x soulangiana* е друг листопаден хибрид с ценни декоративни качества. Изследванията за *in vitro* размножаване на видове от род *Magnolia* и в частност с *M. grandiflora* са ограничени и като цяло няма оптимизиран протокол за *in vitro* размножаване. Въпреки наличието на отделни съобщения за успешни експерименти (Kamenicka и Lanakova, 2000) се счита, че основният проблем при *in vitro* култивирането на *Magnolia*,

All rooted and nonrooted microshoots were assigned for *ex vitro* rooting and acclimatization in peat: perlite (1:1). In 60 days a remarkable high rate of *ex vitro* rooting and survival was recorded in both species – up to 100% of the plants grown *in vitro* on agar-based medium with 1.48 μ M IBA + 1.14 μ M IAA in under light conditions, followed by the same treatment with perlite-based medium (90%).

Key words: *Magnolia grandiflora*, *M. x soulangiana*, *in vitro*, rooting, IBA, IAA, perlite.

INTRODUCTION

Magnolia grandiflora (southern magnolia) is more widely cultivated throughout the world than any other evergreen ornamental tree. It is a tree of remarkable aesthetic, medicinal and timber values (Tresender, 1978). *M. x soulangiana* is another deciduous hybrid of *Magnolias* with high aesthetic importance.

A few studies were focused on *in vitro* micropropagation of the species from genus *Magnolia*, in general, and *M. grandiflora*, in particular and there wasn't an optimized *in vitro* methodology.

In spite of the fact that some successful studies had been conducted regarding rooting of *M. x soulangiana* (Kamenicka and Lanakova, 2000), rooting *in vitro* had been regarded as the main problem related to *Magnolia*

който ограничава масовото микроразмножаване на този вид, е трудното вкореняване (Shi *et al.* 2002).

При растителните тъканни култури вкореняването на микрорезниците може да бъде постигнато *in vitro* или *ex vitro* (Geert-Jan *et al.* 1997). Едни от най-важните фактори, влияещи на вкореняването *in vitro* са редуцирането на солите в хранителната среда (Bhojwani and Razdan, 1996), прехвърлянето на блокираните меристемоиди на нова среда с различна комбинация от растежни регулатори, или без растежни регулатори (Minocha 1987) или използване на подходящи ауксини, главно IAA, IBA или NAA (George and Sherrington, 1984). Продължителното въздействие на високи ауксинови нива, може да доведе до нежелани ефекти, като калусиране, хлороза по листата, потискане растежа на корена и спиране на растежа на летораста (Maynard *et al.*, 1991). За предотвратяване на тези явления се предлага въздействия с тъмнина или използването на порести субстрати в хранителната среда *in vitro* вместо агар. (Bhojwani and Razdan, 1996, Thorpe *et al.* 2008). Друг подход при трудно вкореняващи се видове е вкореняването *in vivo*. *In vivo* формираните корени са структурно и функционално по-

microculture which was considered a deterrent to the development of an efficient *in vitro* system for this genus (Shi *et al.* 2002).

In plant tissue culture, rooting of microcuttings could be achieved either *in vitro* or *ex vitro* (Geert-Jan *et al.* 1997).

Among the most important factors affecting rooting *in vitro* were reduction of nutrient salts in the medium (Bhojwani and Razdan 1996), transferring blocked meristemoiids into a new medium containing either a different combination of growth regulators or no growth regulators (Minocha 1987) or using a suitable auxin, mostly IAA, IBA or NAA (George and Sherrington, 1984).

Prolonged exposure to high auxin levels, however, had some undesirable effects, such as callusing, leaf chlorosis, inhibition of root elongation and quiescence or dormancy in the shoot tip which was difficult to overcome in the acclimatization stage *ex vitro* (Maynard *et al.*, 1991).

Other treatments as dark and using porous substrates in the nutrient medium *in vitro* instead of agar had been suggested (Bhojwani and Razdan 1996, Thorpe *et al.* 2008). On the other hand, *ex vitro* rooting was gaining popularity for obvious reasons of economy and the quality of roots.

качествени от тези, формираны *in vitro*, избягва се нараняване на корените при изваждането им от твърдата хранителна среда, а създаването на подходящи условия за ризогенез *in vivo* е по-лесно и по-евтино (Bhojwani and Razdan, 1996).

Цел на настоящото проучване е да се изследват възможностите за вкореняването на *in vitro* култивирани растения от *Magnolia grandiflora*, L. и *Magnolia x soulangiana*, Soul.-Bod. *in vitro* и/или *ex vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал

Всички експерименти са проведени с *in vitro* растения от *M. grandiflora* and *M. x soulangiana*, култивирани на хранителна среда по MS (Murashige and Skoog, 1962), обогатена с 3.1 μM BAP (6-benzylaminopurine), 0.057 μM IAA (indol-3-acetic acid), 40 g l⁻¹ захароза и 5 g l⁻¹ агар с pH 5.6 преди автоклавиране. *In vitro* културата е поддържана чрез прехвърляне на свежа хранителна среда на всеки 3-4 седмици.

В опитите за оптимизиране на вкореняването са използвани добре развити микрорастения. Удължаването е проведено на гореописаната хранителна среда без хормони, в полипропиленови съдове с газопроницаемо покритие

Ex vitro rooting offered many advantages, for example combining rooting and acclimatization stages and, thus, reducing aseptic handling. *In vivo* formed roots were structurally and functionally of better quality than those developed *in vitro*.

The *in vitro* developed roots may get damaged during transplantation and for difficult-to-root species it was easier and cheaper to create good rooting conditions *in vivo* than *in vitro* (Bhojwani and Razdan, 1996).

MATERIAL AND METHODS

Plant material

All experiments were performed with *in vitro*-raised microshoots of *M. grandiflora* and *M. x soulangiana* cultured on MS medium (Murashige and Skoog 1962) containing 3.1 μM BAP (6-benzylaminopurine), 0.057 μM IAA (indol-3-acetic acid), 40 g l⁻¹ sucrose and 5 g l⁻¹ agar with the pH adjusted to 5.6 before autoclaving.

Both species were maintained as stabilized shoot cultures by subculturing into fresh medium at 3-4 weeks interval.

Lateral shoots were excised and used for rooting in the present study after elongation on the basal medium free of growth regulators for a period of 4 weeks in Full-Gas Microboxes (Combiness_{IV},

(Combiness_{nv}, Belgium, жълт филтър – скорост на газообмен 13 обема на ден) за 4 седмици. Всички микрорастенията са култивирани при температура 22±2°C и фотопериод 16h ден/8h нощ (флуоресцентни лампи OSRAM, 40W; 40 μmol m⁻²s⁻¹ PPFD), ако не е отбелязано друго.

Вкореняване ин витро

Единични удължени връхчета с височина 3÷4 см са култивирани на основна MS хранителна среда с 25% макросоли, 100% микросоли, 100% витамини, 20 g l⁻¹ захароза, 5 g l⁻¹ агар (pH 5.6).

Експеримент 1.

Микрорезници от двата вида са заложили за вкореняване *in vitro* на хранителни среди с IBA - 0.0, 2.46, 4.92, 24.60 μM.

Експеримент 2.

Микрорезници от *M. grandiflora* са третирани по три начина: А. различно съдържание на ауксини (1.5 μM IBA, 1.5 μM IBA + 1.14 μM IAA and 1.5 μM IBA + 2.85 μM IAA); В. хранителна среда – твърда агарова среда или течна среда с перлит; С. условия на култивиране – на тъмно или с 16-h фотопериод.

И в двата експеримента са използвани споменатите по-горе съдове, но със зелен филтър (скорост на газообмен 81.35 обема на ден), със 100 ml хранителна среда. За всеки вариант на третиране са заложили по 4 съда с най-малко

Belgium) with yellow filter (13.09 gas exchanges/day). All cultures through the whole course of the study were kept at 22±2°C under 16-h photoperiod (fluorescent tubes OSRAM 40 W, 40 μmol m⁻² s⁻¹ PPED), unless otherwise specified.

Rooting in vitro

Single elongated shoots 3-4 cm long were cultured on MS basal medium with 25% macronutrients, 100% micronutrients, 100% MS vitamins, 20 g l⁻¹ sucrose, 5 g l⁻¹ agar and a pH of 5.6.

Experiment 1. Microshoots of both species were cultured *in vitro* on nutrient media with four levels of IBA (indol-3-butyric acid) - 0.0, 2.46, 4.92, 24.60 μM.

Experiment 2. Microshoots of *M. grandiflora* were subjected to different treatments concerning: A. auxin level (1.5 μM IBA, 1.5 μM IBA + 1.14 μM IAA and 1.5 μM IBA + 2.85 μM IAA); B. medium type (solid agar-based and liquid in perlite) and C. growing condition (dark and light 16-h photoperiod).

In both experiments, the previously mentioned Microboxes were used with green filter (81.35 gas exchanges/day), filled with 100 ml of culture media. Each treatment consisted of four jars with at least 10 shoots contained in each jar. In case of liquid medium, the media were sterilized in

заложен по 4 съда с най-малко 10 връхчета на съд. За вариантите с течна хранителна среда, средата се стерилизира отделно в колби и се долива на ламинар-бокс към предварително стерилизираните съдове с перлит. Вкореняването е отчитано след 4 седмици.

Ex vitro вкореняване и аклиматизация

Всички вкоренени и некоренени *in vitro* микрорезници от двата експеримента са заложен за аклиматизация. За целта са използвани пластмасови форми за разсад с 56 гнезда, напълнени с торфено перлитна смес (1:1), без допълнително третиране на растенията с хормони. Растенията са култивирани при температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$, фотопериод 16h ден/8h нощ (флуоресцентни лампи OSRAM, 40W; $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD) и висока относителна влажност за 2 седмици. Относителната влажност постепенно е намалявана и растенията са прехвърлени в по-големи саксии със същия субстрат в стъклена оранжерия. Вкореняването и аклиматизацията са отчитани периодично, като финалните резултати са записани 60 дни след изваждането в *ex vitro* условия по варианти на *in vitro* третиране.

beakers and subsequently poured to perlite-filled micoboxes, previously sterilized, under laminar flow-hood conditions.

After 4 weeks, data on *in vitro* rooting were recorded.

Ex vitro rooting and acclimatization

All rooted and nonrooted microshoots resulted from the *in vitro* study were assigned for *ex vitro* rooting and acclimatization. Multi-cell bedding plant trays filled with peat:perlite (1:1) were used with no additional hormonal treatments.

Cultures were kept in growth chamber under 16h photoperiod (fluorescent tubes OSRAM 40 W, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPED) and high humidity conditions for 2 weeks.

Humidity was gradually decreased, plantlets were transplanted into pots filled with the same medium and transferred to green house conditions.

Data on *ex vitro* rooting and plant adaptation were periodically recorded.

Data on final acclimatization rate were collected 60 days after transplanting to *ex vitro* conditions.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Влияние на различни концентрации на IBA в хранителните среди върху вкореняването на *M. grandiflora* and *M. x soulangiana*

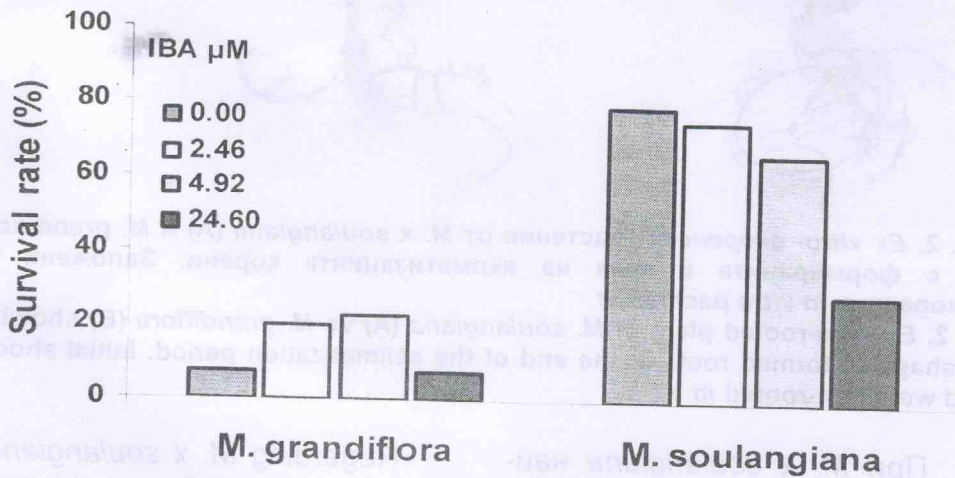
С изключение на единични растения (4 броя от *M. x soulangiana* и едно от *M. Grandiflora*) при нито една от четирите изпитани концентрации на IBA (0.0, 2.46, 4.92, 24.60 μM) не е наблюдавано коренообразуване след 30 дни *in vitro* условия. Микрорезниците от двата вида са вкоренени и аклиматизирани успешно при *ex vitro* условия и в края на адаптационния период е отчетен процента на преживяемост (Фигура 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of different levels IBA *in vitro* on rootability of both *M. grandiflora* and *M. x soulangiana*

Except for some individuals (4 shoots *M. x soulangiana* and one shoot from *M. grandiflora*), no rooting was recorded after 30 days cultivation *in vitro* using any of the four levels tested of IBA - 0.0, 2.46, 4.92, 24.60 μM .

Microshoots of both species were successfully rooted *ex vitro* and survived acclimatization conditions. By the end of the acclimatization period, data on final acclimatization rate were recorded (Figure 1).



Фиг. 1. Успешна аклиматизация (%) на микрорастения от *M. grandiflora* и *M. xsoulangiana*, култивирани *in vitro* на хранителна среда за вкореняване с различни концентрации на IBA.

Fig. 1. Final successful acclimatization rate (%) of *M. grandiflora* and *M. x soulangiana*, cultivated on rooting media with different concentrations of IBA.

Растенията имат добре | Plants demonstrated well

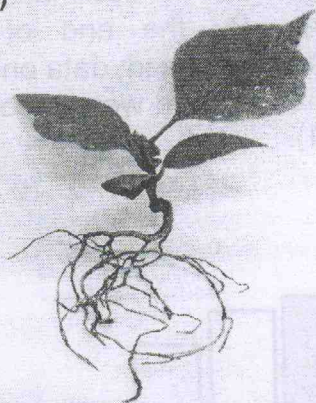
развита коренова система (Фигура 2). Отбелязана е значителна разлика в ризогенния потенциал на двата вида *ex vitro*. От всички първоначално заложили микрорезници от *M. x soulangiana* са вкоренени и аклиматизирани 62%, докато при *M. grandiflora* този процент е едва 14%. Като цяло, с повишаване концентрацията на IBA *in vitro* процентът на успешно адаптираните *ex vitro* растения намалява.

developed roots (Figure 2).

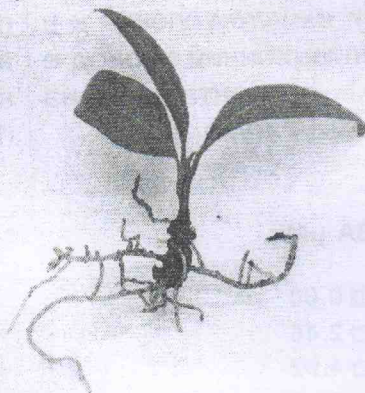
A considerable difference in the rooting ability *ex vitro* of *M. x soulangiana* (62% of the total initial microshoots) comparing with that of *M. grandiflora* (14%) could be noticed.

Generally, increasing the concentration of IBA *in vitro* reduced survival rate *ex vitro*.

(A)



(B)



Фиг. 2. *Ex vitro*- вкоренени растения от *M. x soulangiana* (A) и *M. grandiflora* (B), с формираните в края на аклиматизацията корени. Заложени са невкоренени *in vitro* растения

Fig. 2. *Ex vitro*-rooted plant of *M. soulangiana* (A) vs *M. grandiflora* (B) showing the shape of formed roots at the end of the acclimatization period. Initial shoots used were non-rooted *in vitro*

При *M. x soulangiana* най-висок процент (79.17%) е отчетен при контролния вариант без ауксин, следван от варианта с най-ниска концентрация на IBA (2.46 μ M) – 75%. От друга страна, микрорезниците от *M. grandiflora* от контролния

Regarding *M. x soulangiana*, microshoot survival was highest (79.17%) with the control (no auxin treatment) and after application of the lowest concentration of IBA (2.46 μ M) – 75%.

Microshoots of *M.*

вариант без ауксин и с най-висока концентрация на IBA (24.60 μ M) показват най-слаба преживяемост (7.5%), докато използването на IBA в по-ниски концентрации (2.46 μ M, 4.92 μ M) има по-добър ефект (съответно 20.00% и 22.50%).

Получените резултати вероятно се дължат на факта, че IBA е относително високо стабилен ауксин и се фотоокислява в ниска степен. След индуциране развитието на коренови меристемоиди, високите концентрации на ауксини имат инхибиторен ефект. В нашия експеримент това може да е причина за понижаване в процента на аклиматизация и при двата вида магнолия при най-високите концентрации на ауксин. Противоположно на нашите резултати Kamenicka и Lanakova (2000) съобщават за стимулиране на вкореняването и броя на формираните корени при *M. x soulangiana* с използване на по-високи концентрации на IBA (19.6 μ M). Тези несъответствия могат да се дължат на различия в генотипа при този хибрид, както и на разлики в хранителната среда и размера на използваните микрорезници. По отношение на *M. grandiflora*, са необходими повече изследвания за подобряване на вкореняването при *in vitro* или *ex vitro* условия.

grandiflora, on the other hand, recorded the lowest survival (7.5%) using either no auxin (control) or IBA at the highest concentration (24.60 μ M), whilst application of IBA at lower concentrations (2.46 μ M, 4.92 μ M) increased survival rate (20.00%, 22.50%, respectively).

Our results probably were related to the fact that IBA was considered as a high stable auxin and was photooxidized to a low extent.

After IBA induced formation of root meristemoids, high concentrations of auxin become inhibitory. This could be a reason for the decrement in the acclimatization rate of both *Magnolia* species at the highest auxin concentration in our experiment.

On the contrary to our results, Kamenicka and Lanakova (2000) reported stimulation of root production and number of roots in *M. x soulangiana* using higher level of IBA (19.6 μ M).

Differing results regarding rooting of *M. x soulangiana* may be attributed to the genotype variations in this hybrid in addition to the differences in the rooting medium and size of microshoots used which may contribute in these contrasts. *M. grandiflora*, however, needed more effort to

По-добрият растеж на двата вида на хранителна среда по MS в нашите опити е свързана по някакъв начин и със синтеза и отделянето на фенолни компоненти. Това би могло да се дължи на инхибиране на ауксиновото оксидиране или на неочаквани ефекти на фенолите (Machakova *et al.*, 2008). Всички тези фактори може би имат отношение към липсата на вкореняване *in vitro*.

Влияние на различните ауксини (IBA и IAA), физичното състояние на хранителната среда и третирането с тъмнина (светлинния режим) върху *in vitro* вкореняването на *M. grandiflora*

В експеримент 2 опитахме да индуцираме ризогенез *in vitro* при *M. grandiflora* чрез комбиниране на IBA в сравнително ниска концентрация ($1.48\mu\text{M}$) с IAA в две различни концентрации ($1.14\mu\text{M}$ or $2.85\mu\text{M}$) и вариране в условията на култивиране.

След 4 седмично култивиране вкореняване не бе установено. Всички връхчета са прехвърлени в *ex vitro* условия. След 8 седмици процентът на успешно адаптираните (и съответно вкоренени) растения варира между 60% и 100%. Между двата начина на третиране (тъмно/светло) бяха отчетени и известни разлики в крайния процент на

enhance its rooting either *in* or *ex vitro*.

Besides, the improvement in growth of both species on MS medium was observed to be related in some way to the excretion of phenolic compounds. This could lead to inhibition of auxins oxidation, or to other unexpected effects of phenolics (Machakova *et al.*, 2008). All these factors could contribute to the absence of rooting *in vitro*.

Effect of different auxins (IBA and IAA), physical state of the growth medium and darkness on *in vitro* rooting of *M. grandiflora*

In experiment 2 we attempted to induce *in vitro* rooting in *M. grandiflora* using a mixture of IBA at low concentration ($1.48\mu\text{M}$) combined with IAA at two different concentrations ($1.14\mu\text{M}$ or $2.85\mu\text{M}$).

Physical state of the medium (solid or liquid) was considered along with darkness treatment during the first 10 days of the culture.

After four weeks in culture, no roots were detected. All shoots were then transferred to *ex vitro* conditions. After 8 weeks the survival (rooting) rate of the plants reached 60% to 100%.

Slight differences were

преживяемост (73.33% и 85.00%, съответно). Това вероятно се дължи на факта, че култивирането на тъмно през първите 10 дни влияе негативно върху качеството на растенията. В края на *in vitro* вкореняването растенията, култивирани на светло, са по-жизнени, с калус в основата (Фигури 3 и 4).

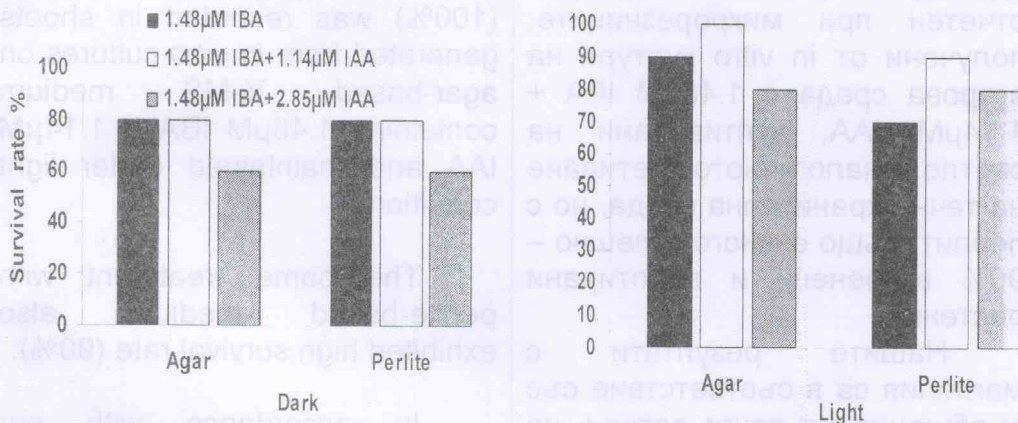
Агаровите среди и течните с перлит най-общо показват малки различия (81.67% и 76.67%, съответно). По отношение на ефекта на ауксина – комбинирането на 1.14 μ M IAA с 1.48 μ M IBA *in vitro* повишава процента на успешно вкоренените и адаптирани растения от 80% (само с IBA) до 87.5%.

recorded between dark and light-treated shoots regarding final survival rate (73.33% and 85.00%, respectively).

The initial 10-day dark period *in vitro* generally was detrimental to plantlet quality. Shoots raised under light conditions were healthy and characterized by white callus accumulations at shoot bases (Figure 3 and 4).

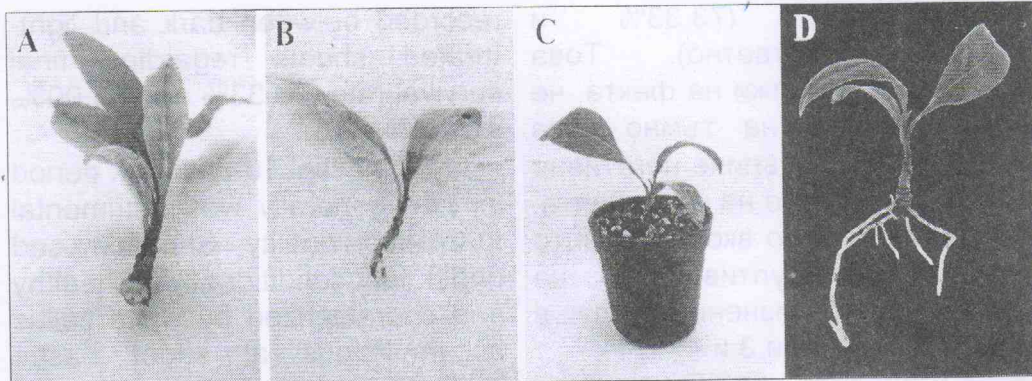
Agar-based and perlite-based media, generally, exhibited slight differences (81.67% and 76.67%, respectively).

Considering the effect of auxin treatments, combining IAA at 1.14 μ M with 48 μ M IBA *in vitro* increased survival rate from 80% (with IBA alone) to 87.5%.



Фиг. 3. Процент на преживяемост на *ex vitro* вкоренени растения от *M. Grandiflora*, третирани *in vitro* с 1.48 μ M IBA със или без IAA (1.14 μ M или 2.85 μ M)

Fig. 3. Final survival rate of *ex vitro*-rooted plantlets of *M. grandiflora* generated from microshoots subjected to *in vitro* treatment with 1.48 μ M IBA with/without IAA (1.14 μ M or 2.85 μ M)



Фиг. 4. *In vitro* микрорастения от *M. grandiflora*, на среда за вкореняване, отглеждани при различни условия: А. При стандартен светлинен режим; В. Култивирани на тъмно за 7 дни; С. и D. Адаптирано микрорастение
 Fig. 4. *In vitro* raised microshoots of *M. grandiflora* on rooting media, cultivated at different conditions: A. microshoots maintained under light conditions; B. microshoots subjected to darkness treatment for 7 days; C. and D. Acclimatized *ex vitro*-rooted plantlets

Добавянето на по-високи концентрации IAA ($2.85\mu\text{M}$), обаче, понижава този процент до 70%. Най-висок процент на адаптирани растения (100%) е отчетен при микрорезниците, получени от *in vitro* култура на агарова среда с $1.48\mu\text{M}$ IBA + $1.14\mu\text{M}$ IAA, култивирани на светло. Аналогичното третиране на течна хранителна среда, но с перлит, също е много успешно – 90% вкоренени и адаптирани растения.

Нашите резултати с магнолия са в съответствие със съобщения на други автори, че използването на синтетични ауксини като IBA в комбинация с IAA е по-ефективно в сравнение с прилагането им самостоятелно (Machakova et al., 2008).

Някои автори, например McCown (1988), предполагат, че

Addition of higher IAA concentration ($2.85\mu\text{M}$), however, decreased that rate to 70%.

The highest survival rate (100%) was recorded in shoots generated from *in vitro* cultures on agar-based $\frac{1}{4}$ -MS medium containing $1.48\mu\text{M}$ IBA + $1.14\mu\text{M}$ IAA and maintained under light conditions.

The same treatment with perlite-based medium also exhibited high survival rate (90%).

In accordance with our findings, it had been found by many workers that a synthetic auxin such as IBA combined with IAA was more effective than the synthetic compound on its own (Machakova et al., 2008).

Some authors, for example

врџчетата на много дървесни видове се вкореняват по-успешно, ако се култивират първоначално на тъмно и след това се прехвърлят на светло. Най-общо казано, обаче, след 7-10 дни тъмнината индуцира стареене, и по този начин понижава преживяемостта на микрорастенията (Rugini et al., 1988). Вероятно някои клонове или сортове, като в случая с настоящото изследване, не се нуждаят от тъмнина или са по-чувствителни към фитотоксичните ефекти на IBA (Caboni and Damiano, 1994).

Въпреки че физичното състояние на хранителната среда не влияе съществено според настоящите резултати, много автори като считат, че аерирането на тъканите в порести субстрати като перлита спомага за по-добрия растеж на микрорастенията и за развитието на морфологично по-добра коренова система с множество вторични коренчета (Thorpe et al., 2008, Zhu et al., 2010 and Caro et al., 2003).

ИЗВОДИ

При *M. grandiflora* и *M. x soulangiana* не е постигнато вкореняване *in vitro* при нито един от изпитаните варианти.

Най-висок процент на вкоренени *ex vitro* и адаптирани растения (100%) е отчетен при микрорезниците, получени от *in vitro* култура на агарова среда с

McCown (1988), suggested that shoots of many woody plants root better if they were incubated in darkness during the first phase of rooting and then were transferred to light.

However, darkness, generally, induced shoot senescence after 7-10 days, thereby decreasing plantlet survival (Rugini et al., 1988). Certain clones or varieties, like the case in our study, may not require dark treatment because dark-treated shoots may possibly be more sensitive to the phytotoxic effects of IBA (Caboni and Damiano, 1994).

Although physical state of the nutrient media did not exhibited considerable differences in the present study, there had been many authors who emphasized that aeration of the tissues on a porous substrate like perlite stimulated better plant growth with morphologically better root system with numerous root hairs (Thorpe et al., 2008, Zhu et al., 2010 and Caro et al., 2003).

CONCLUSIONS

No rooting was recorded *in vitro* using any of the tested treatments in either *M. grandiflora* or *M. x soulangiana*.

The highest survival rate of the *ex vitro* rooted plants (100%) was recorded from *in vitro* shoots grown on agar-based $\frac{1}{4}$ -MS medium containing $1.48\mu\text{M}$ IBA +

1.48 μ M IBA + 1.14 μ M IAA, култивирани на светло. Аналогичното третиране на течна хранителна среда, но с перлит също е много успешно - 90% вкоренени и адаптирани растения.

Благодарност

Представеното изследване е подкрепено от програмата Erasmus Mundus External Cooperation Window (EMECW), в рамките на проект 132878-EM-1-2007-BE-ERA Mundus-ECW.

1.14 μ M IAA and maintained under light conditions. The same treatment with perlite-based liquid medium also exhibited high survival rate - (90%).

Acknowledgement

This research had been supported by Erasmus Mundus External Cooperation Window (EMECW) programme, project number 132878-EM-1-2007-BE-ERA Mundus-ECW funded by the European commission.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bhojwani S., and M. Razdan.** 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier, The Netherlands: 767 pp.
2. **Caboni E. and C. Damiano.** 1994. Rooting in two almond genotypes. Plant Sci. 96:163-165.
3. **Caro L., N. Santechia P. Marinangeli N. Curvetto and L. Hernández.** 2003. Agrobacterium rhizogenes vs auxinic induction for in vitro rhizogenesis of Prosopis chilensis and Nothofagus alpine. Biocell, 27(3): 311-318.
4. **Geert-Jan D., T. Jolanda and M. Svetla.** 1997. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in Malus "Jork 9". Plant Cell Tissue Organ Cult 49:39-44.
5. **George E. and P. Sherrington.** 1984. Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Common Laboratories. Exegetics, Eversley, UK.
6. **Kamenicka A. and M. Lanakova.** 2000. Effect of medium composition and type of vessel closure on axillary shoots production of magnolia *in vitro*. Acta Physiol. Plantarum, 22: 129-134.
7. **Machakova I., E. Zazimalova and E. George.** 2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: George, E.F.; M.A. Hall and G.D. Klerk (eds.), Plant Propagation by Tissue Culture, The Background, 3rd edn. vol. 1, Springer, the Netherlands, pp. 175-204.
8. **Maynard C., K. Kavanagh, H. Fuernkranz and A. Drew.** 1991. Black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.). In: Y.P.S. Bajaj (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 16. Trees III. Springer, Berlin, pp. 3-22.
9. **McCown B.H.** 1988. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: Adventitious Root Formation in Cuttings. Eds. T.M. Davis, B.H. Haissig and N. Sankhla. Discorides Press, Portland, OR, pp 289-- 302.
10. **Minocha S.C.** 1987. Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees. In: Bonga JM, DJ Durzan (Eds.). Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology. Springer, The Netherlands: pp. 50-66.
11. **Murashige T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum., 15: 473-497.

12. **Rugini E., A. Jacoboni and A. Bazzoffia.** 1988. A simple *in vitro* method to avoid initial dark period and to increase rooting in fruit trees. *Acta Hort.* 227:438-440.
13. **Shi S., Y. Zhong and W. Hoch.** 2002. Distribution and Commercial Cultivation of *Magnolia*. In: Sarker, S.D. and Y. Maruyama (eds.). *Magnolia: The genus Magnolia*. Taylor and Francis, London, pp 156-180.
14. **Thorpe T., C. Stasolla, E. Yeung, G-J. de Klerk, A. Roberts and E. George.** 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: George E.F., Hall M.A., Klerk G.D. (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture, The Background*. 3rd ed. vol. 1. Springer, The Netherlands: pp. 115-173.
15. **Treseder N.G.** 1978. *Magnolias*. London and Boston: Faber & Faber. 244 p.
16. **Zhu L.H., X. Wu, H. Qu, J. Ji and J. Ye.** 2010. Micropropagation of *Pinus massoniana* and mycorrhiza formation *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 102:121-128.

SUMMARY

The results from the study to determine the response of 12 grapevine varieties and 2 rootstocks to root rot of phytophthora (*Phytophthora viticola*, Homoptera: Phytomyza) are presented.

The classification was carried out in accordance with a score scale of 0-5 for evaluation of the phytophthora resistance after which infection.

The different grapevine species varieties and rootstock show different response to the pest as they are classified into five main groups.

The grapevine rootstocks and the intergeneric varieties Pinaviva form and Taka 1 are characterized with the highest rate of resistance to root rot.

The dependence between the root phytophthora resistance the root rotting and the vine growth for the individual varieties is confirmed.

The intergeneric varieties, especially at the Institute of Viticulture and Enology (IVE), Slav, Plevensk Favor and

РЕЗЮМЕ

Результати дослідження на 12 сортів винограду та 2 підщепи щодо ураження кореневою гниллю фітофтори (*Phytophthora viticola*, Homoptera: Phytomyza) наведено.

Класифікація здійснювалася за шкалою оцінки 0-5 для оцінки ступеня ураження коренів фітофторою після зараження.

Різні сорти винограду та підщепи демонструють різну ступінь ураження шкідником, як і класифікуються до п'яти основних груп.

Підщепи винограду та міжвидові форми Pinaviva та Taka 1 характеризуються найвищою ступенем стійкості до ураження коренів гниллю.

Залежність між ступенем ураження коренів гниллю та ростом винограду для окремих сортів та міжвидових форм підщепи підтверджено.

Міжвидові форми, особливо в Інституті виноградарства та садівництва (ІВС), Слав, Плевенський Фавор та