

ВЛИЯНИЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЯТА НА ЗАХАРОЗА В ХРАНИТЕЛНАТА СРЕДА ВЪВ ФАЗА
УДЪЛЖАВАНЕ ВЪРХУ ВКОРЕНЯВАНЕТО НА *IN VITRO* РАСТЕНИЯ ОТ ЯБЪЛКОВАТА ПОДЛОЖКА
M 26 (*Malus domestica* Borkh)

ЛИЛЯНА НАЧЕВА
Институт по овощарство, Пловдив
E-mail: lilyn@abv.bg

Effect of Sucrose Level in the Nutrient Medium at the Elongation Stage on the Rooting Ability
of *In vitro* Apple Rootstock M 26 (*Malus domestica* Borkh)

L. Nacheva
Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria

Abstract

The aim of the present research is to observe the effect of sucrose level (0 – 6%) in the nutrient medium at the elongation stage on the rooting ability of *in vitro* cultivated apple rootstock M 26 (*Malus domestica* Borkh). The source microplants are maintained on a modified MS multiplication medium (5 µM BAP, 30 g/l sucrose and 5.8 g/l agar). For the present experiment the plantlets are transferred for 14 days on an elongation (hormone-free medium) with the same mineral content with different sucrose concentrations 0, 1, 2, 4 and 6% w/v. They are cultivated in polypropylene vessels with gas-permeable closure (Combiness, Belgium, gas exchange rate – 10 GE/day) for 14 days. After that shoots 20 mm high are set for rooting in the same vessels on two types carbohydrate free medium – solidified with agar or liquid with perlite. Rooting is evaluated after 20 days. The content of glucose, fructose, sucrose, sorbitol and starch in the plants elongated on media with different sucrose concentrations is determined before transferring on rooting media. The increase in the sucrose concentration in the elongation medium (0 – 6%) leads to different content of soluble carbohydrates and starch, especially at the extreme concentrations of 0 and 6%. On a sugar-free nutritional medium (photoautotrophic variant) sorbitol predominates and this confirm the photosynthetic competence of the apple plants *in vitro*. At the highest sucrose concentration (6%) in the elongation medium accumulation of glucose, sucrose and starch in plantlets is observed, but these do not improve the rooting on carbohydrate – free medium. Elongation on the medium with 4% sucrose stimulates rooting on the agar based sucrose-free medium. When rooting is carried out in perlite based liquid medium, rooting percent is in the range of 50 – 65% and the sucrose concentration at elongation stage has no significant effect. The obtained results show some technological approaches for improving the rooting of micropropagated apple rootstock M 26 (*Malus domestica* Borkh).

Key words: *in vitro* culture, carbohydrates, photosynthesis, photoautotrophy, sorbitol

Захарите играят централна роля в метаболизма на растенията. Продукти на фотосинтезата, те са източник на енергия, субстрати за синтеза на важни структурни компоненти, както и резервни материали при растенията. Захарите имат регулаторни функции при фотосинтезата, растежа и развитието не само като метаболити, но и като сигнални молекули. В условията на *in vitro* култура (слабо осветление, ограничен газообмен, висока влажност) захарите имат специфични функции. Според редица автори захарите в хранителната среда лимитират фотосинтезата и пречат на правилното развитие на фотосинтетичния апарат (Van Huylenbroeck and Debergh, 1996; Rybczynski et al., 2007). Според други автори при по-високо съдържание на захароза в хранителната среда растенията натрупват резерви и по-лесно преодоляват прехвърлянето в *ex vitro* условия. Освен това влиянието на захарите зависи от концентрацията – 3% захароза в хранителната среда при култивиране на тютюн повишава фотосинтезата, а 5% я понижава (Kadlecek et al., 2003).

Целта на настоящото изследване беше да се установи влиянието на захарозата (0 – 6%) в хра-

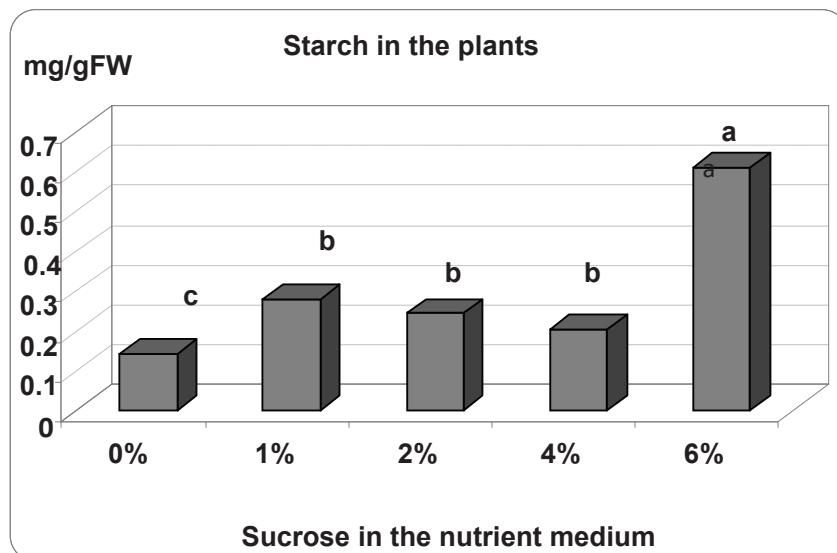
нителната среда, в етапа на удължаване върху вкореняването на *in vitro* култивирани растения от ябълковата подложка M 26.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментите са проведени с микроразмножени растения от ябълковата подложка M 26 (*Malus domestica* Borkh).

In vitro културата се поддържа чрез 3-седмично прехвърляне на хранителна среда на базата на MS (Murashige and Skoog, 1962), обогатена с 5 µM BAP, 30 g/l захароза, 5,8 g/l агар, (pH 5,6 преди автоклавирание).

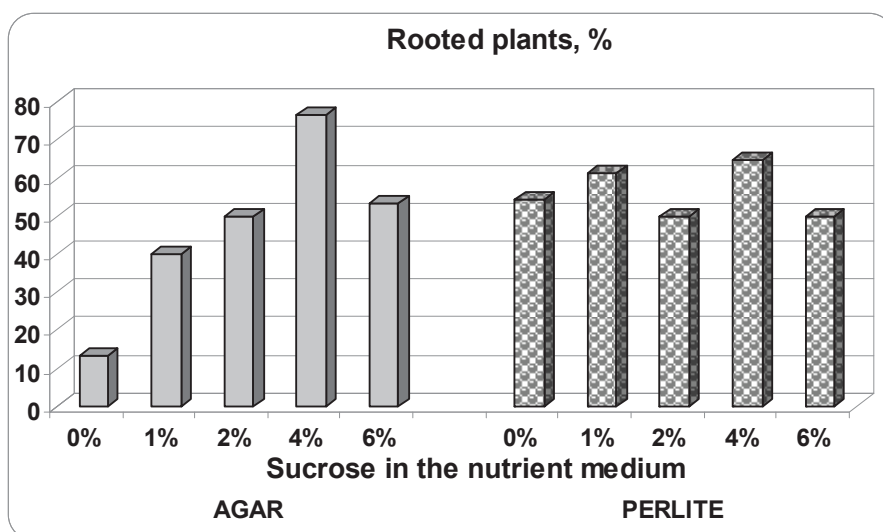
За целта на изследването растенията са прехвърлени на безхормонална хранителна среда със същия минерален състав, но с различни концентрации на захароза – 0, 1, 2, 4 и 6%. Култивирани са в полипропиленови съдове с газопроницаемо покритие (Combiness, Belgium, gas exchange rate – 10 GE/day) за 14 дни. След това връхчета с дължина 20 mm са заложени на среда за вкореняване (MS, с 25% макроелементи и 1,5 µM IBA) без добавяне на захароза – агарова (5,8 g/l) или течна с перлит.



Фиг. 1. Влияние на концентрацията на захароза в хранителната среда в етапа на удължаване върху съдържанието на скорбяла в *in vitro* култивирани растения от ябълковата подложка М 26 (*Malus domestica* Borkh). Различните букви на всяка колона показват съществена разлика по Дънкан (DMRT) ($P < 0.05$).

Fig. 1. Effect of sucrose level in the nutrient medium at the elongation stage on the starch content of *in vitro* cultivated apple rootstock M 26 (*Malus domestica* Borkh).

Different letters within each column indicates significant difference by DMRT ($P < 0.05$).



Фиг. 2. Влияние на концентрацията на захароза в хранителната среда в етапа на удължаване върху вкореняването в агарова среда или течна хранителна среда с перлит на *in vitro* култивирани растения от ябълковата подложка М 26 (*Malus domestica* Borkh).

Fig. 2. Effect of sucrose level in the nutrient medium at the elongation stage on the rooting efficiency (%) of *in vitro* cultivated apple rootstock M 26 (*Malus domestica* Borkh).

За всеки вариант са залагани по 5 културални съда със 100 ml хранителна среда с по 20 растения във всеки съд. Вкореняването на растенията е отчетено след 20 дни.

Всички растения са култивирани в камера с температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и фотопериод 16/8 часа (OSRAM 40 W, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD).

Съдържанието на глюкоза, фруктоза, захароза, сорбитол и скорбяла в растенията е определено преди залагането им за вкореняване. Проби от свеж растителен материал (500 mg) са фиксирани

във врящ 80% етанол, последвано от две екстракции с 80% и 60% етанол за 30 минути всяка. След отделяне на липидите и пигментите (Bligh and Dyer, 1959), разделянето на етанол-водната фракция е извършено с йонообменна хроматография (Dowex 1 в HCO_3^- форма и Dowex 50 в H^+ форма) по методика, адаптирана от Манолов и съавт. (1978). Определянето на отделните въглехидрати е направено по колориметрични методи: глюкоза по глюкооксидазен метод (Щербукин, 1970), фруктоза и захароза – по Nakamura (1968), сорбитол – с хромотропова

Таблица 1. Влияние на концентрацията на захароза в хранителната среда, в етапа на удължаване върху съдържанието на глюкоза, фруктоза, захароза и сорбитол в растения от ябълковата подложка М 26 (*Malus domestica* Borkh)

Table 1. Effect of sucrose level in the nutrient medium at the elongation stage on the content of glucose, fructose, sucrose and sorbitol of *in vitro* cultivated apple rootstock M 26 (*Malus domestica* Borkh)

Sucrose in the nutrient medium	Glucose, mg/gFW	Fructose, mg/gFW	Sucrose, mg/gFW	Sorbitol, mg/gFW
0%	0.74	0.44	2.75	5.11
1%	2.18	2.98	3.12	1.53
2%	2.79	2.93	3.02	5.46
4%	2.04	3.08	3.27	1.36
6%	4.65	0.96	11.23	2.4

киселина (Коренман, 1975), скорбяла – по Вилан. За всеки вариант са анализирани по три успоредни проби.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Съдържанието на захароза в хранителната среда играе важна роля в растежа и развитието на ябълковата подложка М 26 *in vitro*. С нарастване концентрацията на захароза в хранителната среда, във фаза удължаване от 0 до 6% се наблюдават различия в съдържанието на разтворими захари и скорбяла (табл. 1, фиг. 1). Най-отчетливи са тези разлики в двата крайни варианта – без захароза и с 6%. При фотоавтотрофния вариант (без захароза) преобладава сорбитолът и това не е изненадващо и потвърждава фотосинтетичната компетентност на ябълковите растения *in vitro*. Известно е, че сорбитолът е основен краен продукт на фотосинтезата, осъществяващ транспорта на асимилати от листата към другите органи на дървесните овощни видове от семейство *Rosaceae* (Манолов и др., 1979; Wallaart, 1980; Eskobar-Gutierrez and Gaudillier, 1996). При 6% захароза в хранителната среда се наблюдава натрупване на глюкоза, захароза и скорбяла. Трябва да отбележим, че скорбялата е почти 3 пъти повече в сравнение с вариантите 1, 2 и 4% и над 5 пъти повече от варианта без захароза в хранителната среда. При междинните концентрации на захароза между 1 и 4% съществени разлики не се забелязват. Нашите резултати са аналогични на установеното от Carpelades и съавт. (1991), че количеството на скорбяла в листата нараства, когато микрорастенията се култивират при повишена концентрация на захароза. Повишеното скорбялно съдържание според него е свързано с по-ниската нето фотосинтеза. Според редица автори (Aitken-Christe, 1995; Desjardins, 1995) захарозата в хранителната среда понижава активността на ензима Рубиско и по този начин скоростта на нето фотосинтезата на *in vitro* растенията.

Много интересно е как протича вкореняването на така подготвените растения, на среда без захароза. На агарова (твърда) хранителна среда се наблюдава повишаване в процента на вкореняване при растенията, удължавани при по-висока кон-

центрация до 4% (фиг. 2). При 6% захароза процентът вкоренени растения е близък до този при 2%, натрупването на скорбяла при този вариант не повишава процента на вкореняване. Подобни резултати за инхибиране на вкореняването на ябълка (сорт Йорк 9) от високи концентрации на захароза (над 7%) съобщават и De Klerk и др. (1995).

При течна хранителна среда с перлит процентът на вкореняване е в границите на 50 – 65%, независимо на каква концентрацията на захароза са удължавани растенията.

Концентрацията на въглехидратите може да модифицира осмотичния потенциал на средата (Thompson and Thorpe, 1987). Известно е, че високият осмотичен потенциал на хранителната среда понижава растежа и мултипликацията при някои растения. Може да се предполага за такъв ефект и при висока концентрация на захароза в агарова среда.

Култивирането на растенията в културални съдове с газопроницаемо покритие благоприятства развитието на растенията като елиминира натрупването на етилен и токсични концентрации на CO_2 в края на тъмнинната фаза. Същевременно способства за развитието на фотосинтетичната им компетентност и както се вижда от този експеримент, те успешно се вкореняват на среда без захароза в хранителната среда, преминавайки към фотоавтотрофен тип на хранене. Много изследвания показват, че *in vitro* растенията притежават фотосинтетичен потенциал, който обаче е лимитиран от специфичните условия в културалните съдове (Desjardins, 1995; Kozai et al., 1997; Afreen et al., 2002). Нашите изследвания с ябълковата подложка ММ 106, както и със сливовата подложка Джанка 4 (Nacheva and Ivanova, 1998; 2002; 2006; Nacheva et al., 2009) показват, че при подходящи условия на околната среда (главно интензивност на светлината, оптимална концентрация на CO_2 и захароза в хранителната среда) *in vitro* растенията могат да развият положителен въглероден баланс, т. е. да изграждат своя организъм за сметка на фотосинтезата. Фотосинтетичната продуктивност на микрорастенията може да бъде значително повишена чрез адекватен контрол на факторите на околната среда. По този начин те биха били по-добре подготвени за преминаване към *ex vitro* условия и по-лесно ще преживея процеса на адаптация след изваждането им от културалните съдове.

ИЗВОДИ

Удължаването на среда с 4% захароза в съдове с газопроницаемо покритие стимулира вкореняването на агарова хранителна среда без въглехидрати при *in vitro* растения от ябълковата подложка М 26.

Високото съдържание на захароза в хранителната среда (6%), във фаза удължаване, води до натрупване на глюкоза, захароза и скорбяла в ябълковите растения, но това не стимулира вкореняването им на среда без въглехидрати.

Концентрацията на захароза във фаза удължаване не влияе съществено върху процента на вкореняване в течна хранителна среда без захароза с перлит.

ЛИТЕРАТУРА

- Манолов, П., Рангелов, Б. и Бориченко, Н.** 1978. Экстракция и радиохроматографско разделяне на ранните продукти на фотосинтезата при висшите СЗ растения. *Физиология на растенията*, IV, 2: 23-34
- Коренман, И. М.** 1975 Фотометрический анализ. *Мир*, Москва, с. 210
- Манолов, П., Бориченко, Н. и Рангелов, Б.** 1979. Образование сорбитола в процессе фотосинтеза у 14 плодовых пород се. Розоцветных. –В: Фотосинтетическая ассимиляция CO₂ и фотодыхание. *БАН*, София, 86-91
- Шербукин, В.** 1970. Прикладная биохимия и микробиология. Том IV, (4): 467-470
- Afreen, F., Zobayed, S. and Kozai, T.** 2002. Photoautotrophic Culture of Coffea arabusta Somatic Embryos: Photosynthetic Ability and Growth of Different Stage Embryos. *Annals of Botany*, 90: 11-19
- Aitken - Christie, J., Kozai, T., and Smith, M.** 1995. Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Bligh, E. and Dyer, W.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37 (8): 911-917
- Capellades, M., Lemeut, R., and Debergh, P.** 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 25: 21-26
- De Klerk, G., Keppel, M., Ter Brugge, J. and Meekes, H.** 1995. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *J. Exp. Bot.*, 46: 965-972
- Desjardins, Yves.** 1995. Factors affecting CO₂ fixation in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1: 13-25
- Eskobar-Gutierrez, A. and Gaudiller, J.** 1996. Distribution, metabolism et role du sorbitol chez les plantes supérieures. *Agronomy*, 16: 281-298
- Kadlecek, P., Rank, B. and Ticha, I.** 2003. Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* grown plantlets. *J. Plant. Physiol.*, 106: 1017-1024
- Kozai, T., Kubota, C., Jeong, B.** 1997. Environmental control for large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 51: 49-56
- 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). *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 12 (1): 39-44
- Nacheva, L. and Ivanova, K.** 2006. Influence of the gas-permeable closure of the vessels on the growth of *in vitro* cultured fruit plants. *Agricultural Science*, 4: 26-32
- Nacheva, L., Zlatev, Z., Ivanova, K.** 2009. Effect of sucrose level on the photosynthetic ability of *in vitro* cultivated apple rootstock MM 106. *Acta Hort.* (ISHS), 839: 343-350
- Nacheva, L., Zlatev, Z., Ivanova, K., Manolov, P.** 2002. Possibilities for Application of Photoautotrophy in Micropropagation of Dzhanka 4 Rootstock. *Acta Horticulturae*, 577: 199-207
- Nakamura, M.** 1968. Determination of fructose in the presence of large excess of glucose. *Agric. Biol. Chem.*, 32: 701-706
- Rybczynski, J., Borkowska, B., Fiuk, A., Gawronska, H., Sliwinska, E. and Mikula, A.** 2007. Effect of sucrose concentration on photosynthetic activity of *in vitro* cultures *Gentiana kuroo* (Royle) germlings. *Acta Physiol. Plant.*, 29: 445-453
- Thompson, M. and Thorpe, T.** 1987. Metabolic and non-metabolic roles of carbohydrates. In: Bonga, J. and Durzan, D. (eds). *Cell and Tissue Culture in Forestry*, p. 89-112. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Van Huylenbroeck, J. and Debergh, P.** 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiol. Plant.*, 96: 298-304
- Waallaart, R.** 1980. Distribution in sorbitol in Rosaceae. *Phytochemistry*, 19: 2603-2610