



**ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА ИЗПОЛЗВАНЕ НА СЪДОВЕ С ГАЗОПРОНИЦАЕМО
ПОКРИТИЕ ЗА ИН ВИТРО КУЛТИВИРАНЕ
НА КРУША (*Pyrus communis* L.)
POSSIBILITIES TO USE CONTAINERS WITH A GAS-PERMEABLE COVER
FOR *IN VITRO* PEAR CULTIVATION (*Pyrus communis* L.)**

**Наталия Димитрова^{1*}, Лиляна Начева^{1,2}, Малгожата Берова¹
Natalya Dimitrova^{1*}, Lilyana Nacheva^{1,2}, Malgozhata Berova¹**

¹Аграрен университет – Пловдив, България

²Институт по овощарство – Пловдив, България

¹Agricultural University – Plovdiv, Bulgaria

²Fruit Growing Institute – Plovdiv, Bulgaria

***E-mail: natalka_dmt@abv.bg**

Abstract

The experimental work was carried out using the pear rootstock *Old Home x Farmingdale OHF-333* (*Pyrus communis* L.) in the Plant Biotechnology Laboratory of the Fruit Growing Institute in Plovdiv, Bulgaria. All the *in vitro* plants were cultivated in a growth chamber at a temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ and photoperiod of 16/8 hours ($40\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ PPFD). The *in vitro* culture was sustained through a 3-week subculturing of the modified nutrient medium MS, enriched with $2,5\ \mu\text{M}$ BAP or *meta*-topolin (mT), $0,05\ \mu\text{M}$ IBA, $30\ \text{g l}^{-1}$ sucrose, $6,5\ \text{g l}^{-1}$ agar. For the purpose of carrying out the experiments, glass (G) and polypropylene (PP) containers (600 ml) were used.

The PP containers were equipped with a green filter enabling gas exchange with the environment. The physiological and biochemical analyses showed that the plants grown in polypropylene containers with improved gas exchange with the environment had a better physiological status compared with those grown in glass jars.

Key words: pear, micropropagation, growth parameters, physiological indicators.

ВЪВЕДЕНИЕ

За култивирането на растителни тъкани *in vitro* се използват сравнително малки, плътно затворени културални съдове, за да се гарантира стерилността и да се предотврати дехидратацията на тъканите. Неминуемо това възпрепятства свободния обмен на газове между културалния съд и външната атмосфера и създава специфични условия – висока относителна влажност, ниско осветление, големи денонощни колебания в концентрацията

на CO₂, високо съдържание на захари в хранителната среда, натрупване на токсични субстанции, вкл. и етилен, отсъствие на микроорганизми и др. Високата атмосферна влажност в културалните съдове е причина за недобре формирана кутикула, недостатъчно епикутикларни восъци по повърхността на листата, непълноценна функция на устицата и липса на механизми за регулиране на загубите на вода от микрорастенията (Brainerd and Fuchigami 1981; Ziv, 1991). Всичко това води до ниско ниво на транспирация и фотосинтеза, високо ниво на тъмнинно дишане и като резултат от това до формиране на растения с анормална морфология, анатомия и физиология. Такива растения трудно преодоляват стреса в процеса на адаптация към условията на външната среда.

Съвременните изследвания показват, че слабата фотосинтеза на растенията *in vitro* се дължи главно на условията в културалните съдове (Kozai and Sekimoto, 1988; Cournac et al., 1991). Все по-широко се налага мнението, че фотосинтетичната компетентност на тези растения може да бъде важен фактор, определящ преживяемостта им в процеса на аклиматизация към външните условия (Grout and Donkin, 1987).

Въпреки голямото значение на газовата среда за отглеждането на растителни тъкани *in vitro*, този елемент от тяхната техническа спецификация в недалечното минало е бил често пренебрегван, макар че може да има нежелани последици за ефективността на култивирането заради силното физиологично въздействие на участващите газове – O₂, CO₂ и C₂H₄ (Jackson et al., 1991). През последните години контролирането на газовата фаза (*head space composition*) чрез използването на газопроницаеми покрития намира все по-широко приложение в *in vitro* техниките. Всеизвестен факт обаче е, че понижаването на относителната влажност в културалните съдове води до потискане на пролиферацията и намаляване на коефициента на мултипликация. Затова са нужни конкретни познания за физиологичния отговор на всеки конкретен вид, както и за етапите, в които този тип покрития може да се прилага.

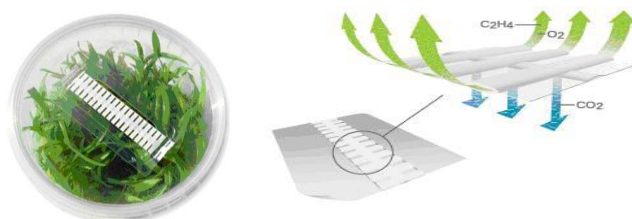
Целта на настоящото проучване е да се изследва влиянието на културалните съдове с газопроницаемо покритие върху растежа и развитието на крушови растения в етап на мултипликация.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Експерименталната работа беше изведена с крушовата подложка Old HomexFarmingdale' OHF-333 (*Pyrus communis* L.) в Лабораторията по растителни биотехнологии към Института по овощарство – Пловдив. Всички *in vitro* растения бяха култивирани във фитостатна камера с температура 22±2°C и фотопериод 16/8 часа (40 μmol m⁻² s⁻¹ PPFD). *In vitro* културата беше поддържана чрез 3-седмично субкултуриране на модифицирана хранителна среда MS (Murashige и Skoog, 1962), обогатена с 2,5 μM BAP или мета-тополин, 0,05 μM IBA, 30 g l⁻¹ захароза, 6,5 g l⁻¹ агар (Phyto agar, Duchefa) (Nacheva et al., 2009).

За извеждане на експериментите бяха използвани стъклени (G) и полипропиленови (PP) съдове с вместимост 600 ml. Във всеки тип съдове

бяха залагани по 10 растения. Стъклените съдове бяха плътно затворени със стъклени капаци и обвити с прозрачно полиетиленово фолио. PP съдове бяха снабдени със зелен филтър, даващ възможност за газообмен с околната среда 81,35 GE/day (<http://www.microbox-container.com/en/scientific>).



Фиг. 1. Полипропиленови съдове с газопроницаем филтър
Fig. 1. Polypropylene containers with gas-permeable closure

Експериментът беше изведен по следната схема:

- Вариант 1. Хранителна среда, обогатена с 2,5 μM ВАР – стъклен буркан;
 - Вариант 2. Хранителна среда, обогатена с 2,5 μM ВАР – полипропиленов съд;
 - Вариант 3. Хранителна среда, обогатена с 2,5 μM тТ – стъклен буркан;
 - Вариант 4. Хранителна среда, обогатена с 2,5 μM тТ – полипропиленов съд.
- Всеки вариант беше заложен в 5 повторения.

Свежата маса на целите растения беше определена тегловно, непосредствено след изваждане от културалните съдове. Сухата маса на растенията беше определена след изсушаване на растителния материал при 80°C за 48 h (Beadle, 1993). Показателите на листния газообмен (P_N – скорост на нето фотосинтезата, E – интензивност на транспирацията, g_s – устична проводимост) бяха определени с портативна фотосинтетична система Lcpro+ (Analytical Development Company Ltd., Hoddesdon, England). Фотосинтетичните пигменти бяха определени спектрофотометрично, а количеството им, изчислено по формулите на Lichtenthaler and Wellburn (1983).

Съдържанието на общите феноли беше определено по Singleton и Rossi (1965). Данните бяха изразени в mg, в еквиваленти на галова киселина (GAE) на 100 g свежа маса ($\text{mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$). Антиоксидантната активност беше определена съгласно с метода на Yen and Chen (1995). Получените резултати бяха обработени чрез анализ One-Way ANOVA и последващ (Tukey тест) при ниво на значимост 95%.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Данните показват (табл. 1; фиг. 2), че най-голям брой леторасълчета над 10 mm е отчетен при варианта с тТ и ВАР, култивирани в стъклени съдове. Това потвърждава заключенията на други изследователи, че при понижаване на влажността в културалните съдове намалява коефициентът на мултипликация. Важно в нашия случай е, че това понижение беше незначително и PP съдове може успешно да се използват в етап на мултипликация при микроразмножаването на круша.

Таблица 1. Биометрични показатели на едно растение в етап мултипликация;
 G – стъклен съд; PP – полипропиленов съд; PGR – растежен регулатор;
 BAP – бензиламинопурин, mT – *мета*-тополин

Table 1. Biometric parameters of *in vitro* pear explant in multiplication stage;
 G – glass jar; PP – plastic (polypropylene) container; PGR plant growth regulator;
 BAP – benzyl amino purine, mT – *meta*-topolin

Var./ Var.	PGR	Култура- лен съд/ Culture vessel	Свежа маса (g)/ Fresh weight (g)	Суха маса(g)/ Dry weight (g)	Общ брой леторасли/ Total number of shoots	Брой странични леторасли/ Number of lateral shoots	Брой леторасли над 10 mm/ Number of shoots more than 10 mm
1	BAP	G	0,3261ab	0,0630a	5,04ab	1,30c	4,4a
2	BAP	PP	0,3815a	0,0660a	4,27b	1,30c	4,1ab
3	mT	G	0,3308ab	0,0550ab	5,73a	2,26b	4,6a
4	mT	PP	0,3373ab	0,0560ab	5,65a	2,85a	4,2ab

*Стойностите, обозначени с една и съща буква, не се различават съществено при $P = 0.05$
 *The values marked with the same letter are not significantly different at $P = 0.05$



Фиг. 2. Микрорастения от крушова подложка OHF-333, култивирани в стъклени буркани и PP съдове; на хранителна среда с BAP (a) и на хранителна среда с mT (b)/**Fig. 2.** Pear rootstock plantletss OHF-333, cultured in glass and PP containers; on nutrient media, supplemented with BAP (a) and on nutrient media, supplemented with mT (b)

Съдържанието на *хлорофил а* в растенията, култивирани в стъклен съд върху хранителната среда с ВАР, е по-високо спрямо останалите варианти средно със 17% (табл. 2).

По отношение на *хлорофил b* и каротиноидите налице е подобна тенденция. Не са наблюдавани отклонения от нормата в съотношенията между фотосинтетичните пигменти. Този показател не бива да се разглежда самостоятелно. Поради малкия размер на листата съдържанието на пигментите беше определено в цели растения на база свежа маса. Вариантите с повече странични леторасълчета и с по-голяма биомаса при изчисляването на пигментите показват по-ниски стойности. Този факт е добре документиран в научната литература (Fujiwara et al., 1992).

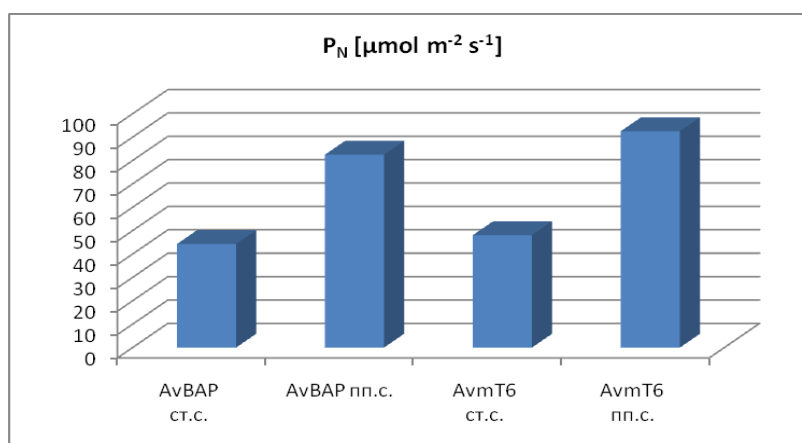
Таблица 2. Съдържание на фотосинтетичните пигменти (mg g^{-1} свежа маса) в етап мултипликация; G – стъклен съд; PP – пластмасов съд; PGR – растежен регулатор; ВАР – бензиламинопурин, мТ – *мета*-тополин

Table 2. Photosynthetic pigment content (mg g^{-1} fresh weight) in multiplication stage; G - glass jar; PP – plastic container; PGR plant growth regulator; ВАР – benzyl amino purine, мТ – *meta*-topolin

Вар. Var.	PGR	Културал. съд/Cultur. vessel	Хл. (a)/ Chl. a	Хл. (b)/ Chl. b	Хл. (Ca+Cb)/ Chl (a+b)	Каротин./ Carotin.	Хл. (a/b)/ Chl (a/b)	Хл. (a+b)/ кар./Chl. (a+b)/car.
1	ВАР	G	0,89 a	0,33 a	1,22 a	0,35 a	2,70 a	3,49 a
2	ВАР	PP	0,72 b	0,32 a	1,04 ab	0,33 a	2,25 ab	3,15 ab
3	мТ	G	0,71b	0,28 ab	0,99 b	0,31 a	2,53 a	3,19 ab
4	мТ	PP	0,77 b	0,32 a	1,09 ab	0,34 a	2,41 ab	3,21 a

*Стойностите, обозначени с една и съща буква, не се различават съществено при $P=0.05$

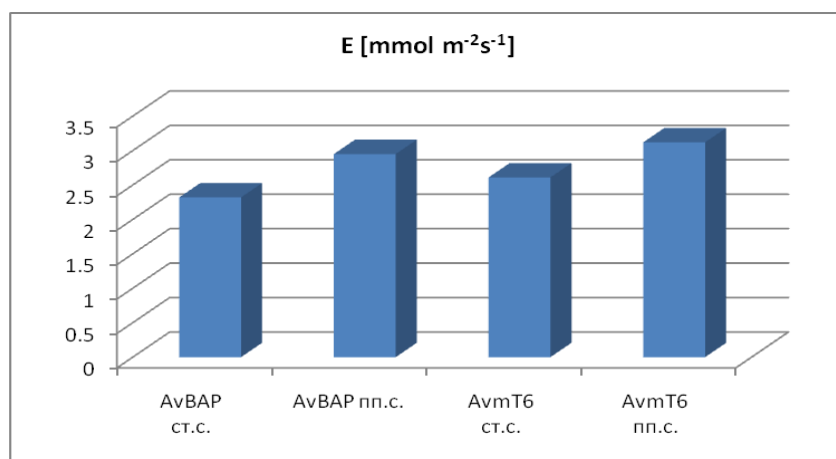
*The values marked with the same letter are not significantly different at $P = 0.05$



Фиг. 3. Интензивност на фотосинтезата P_N [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] на растенията в културален съд/**Fig. 3.** Net photosynthetic rate - P_N [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] of explants in container during multiplication stag

Данните за фотосинтезата и транспирацията (фиг. 3 и 4) ясно показват, че растенията, отглеждани в РР съдове с подобрен обмен с околната среда, имат по-ефективна фотосинтеза и по-интензивна транспирация.

Тези резултати подкрепят виждането на редица автори, че качественият състав и количеството на фотосинтетичните пигменти не са единичен критерий за оценка на фотосинтетичната способност на *in vitro* растенията (Fujiwara et al., 1992; Pospisilova et al., 1996).



Фиг. 4. Интензивност на транспирацията E [$\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$] на растенията в културален съд/**Fig. 4.** Transpiration rate E [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$] of explants in jar during multiplication

Получените екстракти от *in vitro* култивираните растения имат ниско съдържание на феноли (табл. 3). Това най-вероятно се дължи на факта, че вторичните метаболити служат като естествена защита на растенията към оксидативен стрес, защитават биологичните молекули от окисление и растенията от микроорганизми, насекоми и тревопасни животни (Sengul et al., 2009), а тези фактори на околната среда са сведени до минимум или изобщо липсват при култивираните растения *in vitro*.

Налице е позитивна корелация между общата антиоксидантна активност и общото съдържание на полифеноли в изследваните растения.

Установената положителна корелация между подобрения газообмен на културалните съдове с околната среда и нето фотосинтезата и натрупването на суха маса е аналогична с получените от нас резултати с ябълковата подложка MM106 в етапите мултипликация и вкореняване (Nacheva and Ivanova, 1998; 2006).

С подобряване на газообмена на съдовете при тази ябълкова подложка е отчетено ускорено поглъщане на ¹⁴CO₂, повишено съдържание на суха маса и фотосинтетични пигменти. Тези данни са в унисон със

съобщенията на редица автори, които потвърждават положителния ефект на подобрения газообмен върху нето фотосинтезата и растежа на микрорастенията. Kubota и Kozai (1992) постигат значително стимулиране на растежа при *Solanum* чрез ускорена вентилация на съдовете.

Подобни са и резултатите с *Gerbera jamesonii* Bolus и *Ficus lyrata* Warb., получени от Jackson et al. (1991). Majada et al. (2001) изследват повърхността на листата на *Dianthus caryophyllus*, култивирани в плътно затворени и вентилирани съдове.

Таблица 3. Съдържание на общи феноли (в еквиваленти на галова киселина (GAE)) и антиоксидантна активност (%) в екстракти от *in vitro* култивирани растения в етап мултипликация; G – стъклен съд; PP – полипропиленов съд; PGR – растежен регулатор; BAP – бензиламинопурин, mT – *meta*-тополин

Table 3. Total polyphenols content (mg gallic acid – GAE 100 g⁻¹) and antioxidant activity against DPPH radical scavenging capacity inhibition in extracts from *in vitro* cultivated pear explants in multiplication stage; G. – glass jar; PP – plastic (polypropylene) container; PGR plant growth regulator; BAP – benzyl amino purine, mT – *meta*-topolin

Вар./ Variants	PGR	Културален съд/ Culture vessel	Полифеноли GAE mg 100 g ⁻¹ св. маса/GAE mg 100 g ⁻¹ fresh weight	DPPH (%)
1	BAP	G	1167,06ab	38,40a
2	BAP	PP	949,72b	33,24ab
3	mT	G	1349,93a	33,65ab
4	mT	PP	798,86c	25,51c

*Стойностите, обозначени с една и съща буква, не се различават съществено при $P = 0.05$

*The values marked with the same letter are not significantly different at $P = 0.05$

Микрорастенията, отглеждани в съдове с газопроницаемо покритие, показват по-добре функциониращи устица в сравнение с тези от плътно затворени съдове. Растения от *Tagetes erecta*, отглеждани в съдове с подобрен газообмен, демонстрират по-здрав вид и по-бърз растеж в сравнение с тези от плътно затворени съдове (Aguilar et al., 2000).

Ефективната вентилация способства за минимизиране на встъкляването при карамфила (Jo et al., 2002) и картофа (Zobayed et al., 2001; Park et al., 2004). Walker et al. (1988) обаче не са установили по-добър растеж при хризантемата в етап на мултипликация.

Независимо от това всички тези изследвания показват важноста на газопроницаемите покрития на културалните съдове за елиминиране на натрупването на етилен, CO₂ и други летливи компоненти в газовата среда за ограничаване на витрификацията и подобряване на хабитуса на микроразмножените растения.

ИЗВОДИ

Извършените физиологично-биохимични анализи показват, че растенията, отглеждани в полипропиленови съдове с подобрен газообмен с околната среда, имат по-добър физиологичен статус в сравнение с тези, култивирани в плътно затворени стъклени съдове.

REFERENCES

Aguilar, L., L. Espadas, J. Coello, B. Maust, C. Trejo, M. Robert, J. Santamaria, 2000. The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field. *J. Exp. Bot.* No 51 (1861).

Beadle, C., 1993. Growth analysis. *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*, (36).

Brainerd, K., L. Fuchigami, 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* No 106 (515).

Cournac, L., B. Dimon, P. Carrier, A. Lohou, P. Chagvardieff, 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated in vitro under different conditions of aeration, sucrose supply and CO₂ enrichment. *Plant Physiol.*, № 97 (112).

Fujiwara, K., S. Kira, T. Kozai, 1992. Time course of CO₂ exchange of potato cultures in vitro with different sucrose concentration in the culture medium. *J. Agr. Met.*, № 48 (49).

Grout, B., M. Donkin, 1987. Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures in vitro and at transplanting into soil. *Acta Hort.*, № 212 (323).

Jackson, M., A. Abbott, A. Belcher, K. Hall, R. Butler, J. Cameron, 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. *Annals of Botany*, Tom 67, № 2 (229).

Jo, M., I. Ham, A. Lee, M. Lee, H. Song, H. Han, S. Woo, 2002. Effect of sealing materials and photosynthetic photon flux of culture vessel on growth and vitrification in carnation plantlets in vitro. *J Korean Soc Hort. Sci.* № 43 (133).

Kozai, T., K. Sekimoto, 1988. Effects of the number of air changes per hour of the closed vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessel and the growth of strawberry plantlets in vitro. *Environ. Control Biol.*, № 26 (21).

Kubota, C., T. Kozai, 1992. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* in vitro under forced and natural ventilation. *Hort Sci.*, No 27 (1312).

Lichtenthaler, H., A. Wellburn, 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.*, №603 (591).

Majada, J., M. Sierra, R. ;Sanchez-Tames, 2001. Air exchange rate affects the in vitro developed leaf cuticle of carnation. *Scientia Horticulturae*, Tom 87, №1 (121).

Murashige, T., F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays for tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, № 15 (473).

Nacheva, L., Gercheva, P., Dzhuvinov, V., 2009. Efficient shoot regeneration system from pear rootstock OHF – 333 (Pyrus comunis L.) leaves. Acta Hort. (ISHS), № 839 (195).

Nacheva, L., K. Ivanova, 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., Tom 12, № 1 (39).

Nacheva, L., K. Ivanova, 2006. Influence of the gas-permeable closure of the vessels on the growth of in vitro cultured fruit plants. Agricultural Science, № 4 (26).

Park, S., J. Jeon, S. Kim, Y. Park, C. Aswath, H. Joung, 2004. Effect of sealed and vented gaseous microenvironment on hyperhydricity of potato shoots in vitro. Sci Hort., № 99 (199).

Pospíšilová, J., J. Catsky, Z. Sestak, 1996. Photosynthesis in plants cultured in vitro. In: Handbook of photosynthesis, eds. M. Pessarakli, N. Dekker.

Sengul, M., N. Yildiz, B. Gungor, Z. Cetin, S. Eser, S. Ercisli, 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. J Pharm Sci., Tom 22, № 1 (102).

Singleton, V., J. Rossi, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Viticult., № 16 (144).

Yen, G., H. Chen, 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. J. Agric. Food Chem., Tom 43, № 1 (27).

Walker, P., C. Heuser, P. Heinemann, 1988. Micropropagation: Studies of gaseous environment. Acta Hort., № 230 (145).

Ziv, M., 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: Debergh, P and Zimmerman, R. (eds) Micropropagation: Technology and Application, pp. 45-69. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Zobayed, S., J. Armstrong, W. Armstrong, 2001. Leaf anatomy of in vitro tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. Plant Sci., № 161 (537).

