



Оригинален научен труд

УДК 634.21:581.143.5(497.7-11)

КУЛТУРА НА ЗИГОТСКИ ЕМБРИОНИ ОД КАЈСИЈА (*PRUNUS ARMENIACA* L.)

Фиданка Трајкова¹, Лилјана Колева-Гудева¹ и Саша Митрев¹

Апстракт: Добивање на *in vitro* регенерирани растенија од касија (*Prunus armeniaca* L.) е важно за производство на подлоги за калемење на висококвалитетни сорти кајсија и за добивање на почетен материјал од кајсија без присуство на болести, посебно вирусот шарка, кој понатаму ќе се користи за калемење и производство на здрави садници. Во ова истражување се користени ембриони извадени од зрели семки на дива кајсија (*Prunus armeniaca* L.) соберени од природни популации или изолирани дрвја во Источна Македонија. MS медиумот збогатен со 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃, 1,6 mg/l BAP + 0,3 mg/l GA₃ и 6 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃ беше користен како медиум за стимулирање на регенерација на изданоци. Од тестираните регулатори на раст во различни комбинации и концентрации единствено MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃ даде позитивни резултати. Изненадувачки, поставените експлантанти на медиумот за вкоренување MS + 2 mg/l IBA резултираа со генерирање на корени, калус, новоформирани ембриони и соматски ембриоиди.

Клучни зборови: кајсија, зиготски ембриони, лисни розети, ембриоиди, вкоренување.

ZYGOTIC EMBRYOS CULTURE FROM APRICOT (*PRUNUS ARMENIACA* L.)

Fidanka Trajkova², Liljana Koleva Gudeva² and Sasa Mitrev²

Abstract: Obtaining *in vitro* regenerated plants from apricot (*Prunus armeniaca* L.) important for production of rootstocks of high quality trait varieties of apricot and for production of starting material for apricot which is disease free, especially from the virus sharka, which will further used for grafting and production of healthy plantlets. In this research are used embryos extracted from mature wild type apricot seeds (*Prunus armeniaca* L.) collected from natural populations and isolated trees in Eastern Macedonia. MS medium with addition of 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃, 1,6 mg/l BAP + 0,3 mg/l GA₃ и 6 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃ for stimulation of shoots regeneration. From tested

¹ Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Земјоделски факултет

² Goce Delcev University - Stip, Faculty of Agriculture



growth regulators in different combinations and concentrations only MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃ gave positive results. Surprisingly, explants cultured on the rooting medium MS + 2 mg/l IBA resulted in generation of roots, callus, newly formed embryos and somatic embryoids.

Key words: *apricot, zygotic embryos, leaf rosettes, embryoids, rooting.*

1. Вовед

Кајсијата (*Prunus armeniaca* L.) најмногу се одгледува во медитеранските земји, Русија, САД, Иран и Пакистан, со вкупна површина во светот од 492.196 ha и вкупно светско производство од 3.956.640 t [1]. Во Република Македонија во 2014 година имало вкупно 181.530 стебла кајсија, од кои 162.399 родни стебла, со вкупно производство од 4.619 t [2].

Во тековните овоштарски практики, размножувањето на кајсијата се врши преку семка, пупки или калемење. Најпогоден метод за размножување на високоприносни сорти кајсија е калемењето, бидејќи ако се користи методот на вкоренување на резници од гранки се соочуваме со проблеми при вкоренувањето. Подлогите за калемење кај кајсијата се добиваат од семки. Користењето на растенијата од *Prunus armeniaca* L. е широко прифатено како подлога за калемење на кајсија. Како дополнување на садници од дива кајсија, можат да се користат и садници од семки од различни генотипови на кајсија. Една од најпосакуваните карактеристики на садниците за калемење е високата 'ртливост на семките. Дормантноста на семките присутна во регионите со умерена клима го спречува 'ртењето на семките, па за да се надмине овој проблем се практикува стратификација, механичка стратификација, хидролиза во вода, регулатори на раст и аплицирање на витамини [3]. Од друга страна, сите коскести овошни видови, меѓу кои и кајсијата, се осетливи на вирусот шарка или plum rox virus (PPV). Овој вирус е еден од економски најважните болести на коскестото овошје. Иако вирусот е ендемски за Источна Европа, со текот на времето е раширен низ цела Европа, Медитеранот, во последно време на неколку локалитети на западната хемисфера. Неодамна се извршени испитувања поврзани со начинот на наследување на отпорноста на кајсијата кон вирусот на шарка (PPV) како начин за создавање на отпорни сорти и справување со вирусот [4]. Во Република Македонија е утврдено присуство на вирусот шарка кај примероци земени од млад овоштарник на слива што укажува дека заразата настанала во производството на садници [5]. Присуството на вирусот шарка кај млади насади од слива наведуваат дека шарката е присутна и кај насади од кајсија. Сите претходно



наведени факти укажуваат за потребата на воведување *in vitro* методи во создавањето, од една страна на квалитетна подлога за калемење на кајсија, а од друга страна добивање на почетен безвирусен материјал од кајсија што ќе обезбеди садници без присуство на шарка.

Досега не се вршени истражувања за ефектот на факторите во *in vitro* култури врз ртењето на зиготските ембриони соберени од дива кајсија во Република Македонија. Од тие причини, главна цел на ова истражување е да се развие протокол за култивирање на ембриони за дива кајсија како надополнување и алтернатива за веќе постоечките техники за ртење на семки од кајсија. Додатна цел на истражувањето е да се добијат целосно регенерирани растенија од кајсија со *in vitro* техника кои не се инфицирани со вирус на шарка.

2. Материјал и методи на работа

Експериментот опишан во овој труд беше спроведен на Катедрата за растителна биотехнологија, Земјоделски факултет при Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Република Македонија. Како почетен растителен материјал беа користени зиготски ембриони од зрели семки на дива кајсија (*Prunus armeniaca* L.), претходно исушени и извадени од семките на кајсија со внимателно кршење. Семките се соберени од природни популации или изолирани дрвја во Источна Македонија.

2.1. Регенерација на изданоци од ембриони на кајсија во *in vitro* услови

Дел од семките и ембрионите беа соодветно третирали со ладен третман на температура од 4°C во времетраење од 15 дена и поставени на MS медиум со определен состав на регулатори на раст. Дел од ембрионите беа извадени од семките и директно беа поставени на MS медиум со определен состав на регулатори на раст.

Ембрионите извадени од семките беа поставени на MS медиум со одредени концентрации на BAP, GA₃ и IBA и беше следен нивниот развој со бележење на соодветните промени. Деталниот опис на составот на MS медиумот збогатен со присуство на одредени концентрации и комбинација од регулаторите на растот е даден во табела 1.

2.2. Стерилизација на почетни експлантати – ембриони

Откако ембрионите беа изолирани од семките тие беа површински стерилизирани со:

- потопување во 70% C₂H₅OH за време од 3 минути,
- потопување во 1,5% Izosan G за време од 10 минути,
- потоа истите беа три пати промиени со стерилна дестилирана вода.



2.3. Аклиматизација на растенијата

Аклиматизацијата на регенерантите беше извршена со нивно пренесување на стерилна смеска од перлит и тресет (1:1) во услови со висока влажност. Пред засадувањето во смеската од корењата на регенираните растенија беше убаво исчистен со пинцета вишокот од медиумот, коренчињата беа измиени со дестилирана вода и беа третирани со фунгицид 0,5 ml/l Beveskore. По засадувањето на регенерантите во смеската тие беа третирани со 20 ml 1/2 MS раствор и 20 ml 0,1 mM АВА. На вториот ден од засадувањето на регенерантите на секоја од пластичните чаши е направен по еден отвор, а од третиот ден регенерантите се полевани со 5 ml 1/2 MS раствор.

3. Резултати и дискусија

На почетокот на експериментот беше извршен третман со ладно (+4°C) и тоа на:

- семките пред вадењето на ембрионите,
- третман со ладно на ембриони поставени на медиум со регулатори на раст и
- ембриони кои беа директно поставени на медиум со растителни хормони без третман со ладно.

Следењето на развојот на ембрионите во текот на експериментот покажа дека најдобар начин да се прекине дорманцијата на зиготскиот ембрион и да се предизвика *in vitro* реакција се постигнува со третман со ладно на ембриони поставени на хормонален медиум.

Во табела 1 се прикажани резултатите од третманот на изолираните ембриони од семки на кајсија и нивното поставување на MS медиум снабден со соодветна концентрација од регулатори на раст и тоа:

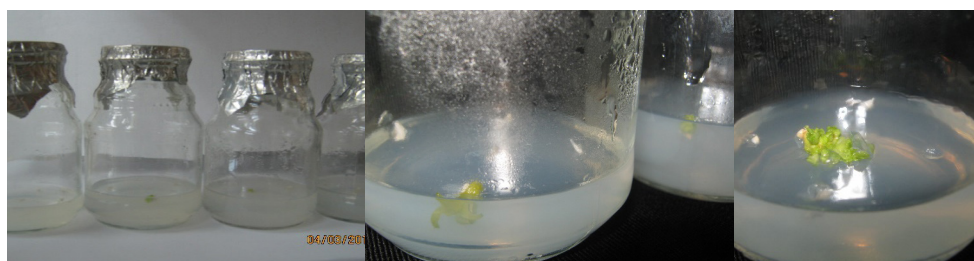
1. MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃
2. MS + 1,6 mg/l BAP + 0,3 mg/l GA₃
3. MS + 6 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃



Табела 1. Третман на семки/ембриони и состав на хормоналниот MS медиум за ртење на ембрионите

Table 1. Treatment of seeds/embryos and content of hormonal MS medium for embryo germination

Третман на семки/ ембриони Seeds/embryos treatment	Број на семки/ ембриони Number of seeds/embryos	Хормонален MS медиум Hormonal MS medium	Надворешни услови за ртење на ембрионите External conditions for embryos germination
Ембриони поставени во петри садови 15 дена на темно на +4°C	31	1 mg/l BAP + 1 mg/l GA ₃	По 15 дена пренесени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно
Ембриони поставени во петри садови 15 дена на темно на +4°C	28	1,6 mg/l BAP + 0,3 mg/l GA ₃	По 15 дена пренесени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно
Семки од кајсија поставени 15 дена на темно на +4°C	55	1 mg/l BAP + 1 mg/l GA ₃	По 15 дена пренесени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно
Семки од кајсија поставени 15 дена на темно на +4°C	44	1,6 mg/l BAP + 0,3 mg/l GA ₃	По 15 дена пренесени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно
Ембриони извадени од семки и директно поставени на медиум	49	1 mg/l BAP + 1 mg/l GA ₃	Директно поставени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно
Ембриони извадени од семки и директно поставени на медиум	37	6 mg/l BAP + 1 mg/l GA ₃	Поставени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно



Слика 1. Про’ртување и формирање лисна розета од ембриони поставени на MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃

Figure 1. Germination and formation of leaf rosette from embryos cultured in MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃



Повеќе различни автори го имаат испитувано влијанието на различни регулатори на раст за регенерација на растенија од различни вегетативни делови на касија и други видови од родот *Prunus* и во најголем дел од истражувањата имаат добиено лисни изданоци [6-8].

По околу еден месец од првичното поставување на ембрионите од касија на MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃ тие дадоа различни видови регенерации, а *in vitro* органогенезата одеше во правец на формирање на 3 лисни розети, 11 *de novo* формирани регенеранти и 2 соматски ембриоиди (табела 2). Добиените регенеранти беа различно третирани во понатамошниот експеримент. Четири *de novo* формирани регенеранти беа засадени на стерилна смеска од тресет и перлит. Нивниот развој и аклиматизација беа следени во понатамошниот тек на експериментот (слика 1).

Табела 2. Ефектот на MS медиумот и различни регулатори на раст на ембрионите од касија по еден месец

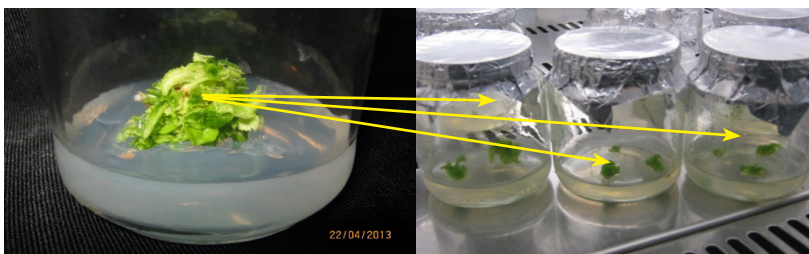
Table 2. Effect of MS medium and different growth regulators on apricot embryos after one month

Почетен хормонален MS медиум Starting hormonal MS medium	Резултати по 1 месец Results after 1 month	Број на почетни експлантанти за пасажирање Number of starting explants for sub-culturing
1 mg/l BAP + 1 mg/l GA ₃	3 лисни розети	30 изданоци
1 mg/l BAP + 1 mg/l GA ₃	11 <i>de novo</i> растенија	6 <i>de novo</i> растенија
1 mg/l BAP + 1 mg/l GA ₃	2 соматски ембриоиди	2 соматски ембриоиди (SME0)



Слика 2. *De novo* регенеранти засадени во стерилна смеска од тресет и перлит и третирани со ABA регулатор на раст за аклиматизација

Figure 2. *De novo* regenerants transplanted into peat and perlite sterile potting mix and treated with ABA growth regulator for acclimatization



Слика 3. Лисна розета поделена на поголем број изданоци кои се пасажирани на MS медиум за вкоренување со 2 mg/l IBA

Figure 3. Leaf rosette divided into numerous number of shoots which are transferred on MS rooting medium with 2 mg/l IBA (b)

Триесет изданоци добиени од 3 лисни розети, 3 *de novo* регенеранти и 2 соматски ембриоиди беа пасажирани на MS медиум за вкоренување во присуство на ауксинот IBA во концентрација од 2 mg/l (слика 3).

Иако поставени на медиум во присуство на ауксин, кој би требало да фаворизира вкоренување, експлантантите различно реагираа на овој медиумот MS + 2 mg/l IBA. Изданоците дадоа калус и со нивно пасажирање на свеж медиум за вкоренување (MS + 2 mg/l IBA) дадоа 4 *de novo* ембриони. Едно *de novo* растение даде калус, 6 растенија корени, 12 соматски ембриоиди и 1 *de novo* ембрион (табела 3, слика 4, слика 5.). Од достапната литература и истражувања се дадени позитивни резултати поврзани со добивање на *in vitro* регенеранти, нивно вкоренување и успешна аклиматизација, но не и успешни протоколи за регенерација на ембриоиди од *Prunus* видови [9-12].



Слика 4. Соматски ембриоиди формирани на *de novo* регенерант на MS + 2 mg/l IBA

Figure 4. Somatic embryoids formed on *de novo* plantlet on MS + 2 mg/l IBA



Слика 5. Новоформиран калус на лисна розета на MS + 2 mg/l IBA
Figure 5. Newly formed callus on leaf rosette on MS + 2 mg/l IBA

Табела 3. Ефектот на медиумот MS + 2 mg/l IBA врз различни типови експлантанти добиени од зиготските ембриони од кајсија по еден месец

Table 3. Effect of MS + 2 mg/l IBA on different explants generated from the apricot zygotic embryos after one month

Хормонален MS медиум Hormonal MS medium	Број на експлантанти Number of explants	Резултати по 1 месец Results after 1 month
2 mg/l IBA	30 изданоци	- новоформиран калус на лисните розети - пасажирање на свеж MS медиум + 2 mg/l IBA - 4 <i>de novo</i> ембриони
2 mg/l IBA	6 <i>de novo</i> регенеранти	- калус на 1 регенерант - калус + корени на 6 регенеранти - 11 соматски ембриониди (SME 1) и 1 <i>de novo</i> ембрион од 1 <i>de novo</i> регенерант (ME1) - 1 соматски ембрион (SME 2) од 1 регенерант (ME2)
2 mg/l IBA	2 соматски ембриониди (SME0)	- пасажирање на свеж медиум MS + 2 mg/l IBA

4. Заклучок

Анализата на добиените резултати покажува дека третманот со ладно (4°C) на ембриони поставени на MS хормонален медиум влијае најповолно за прекин на дорманцијата на ембрионот и негово про’ртување.

Од тестирањето на MS медиум обезбеден со различна комбинација на регулатори на раст во дадени лабораториски услови за регенерација на изданоци од ембриони од кајсија (*Prunus armeniaca* L.), единствено



комбинацијата MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃ даде позитивни резултати. На овој медиум се формираа 3 лисни розети, 11 *de novo* регенеранти и 2 соматски ембриони. За вкоренување на добиените експлантанти беше користен MS медиум со 2 mg/l IBA што резултираше со генерирање на корени, но и на калус, *de novo* ембриони и *de novo* регенеранти. Тоа укажува дека истиот медиум може да се користи за иницирање не само на корени кај регенерантите, туку и за добивање на различен тип на експлантанти и нивно понатамошно *in vitro* истражување. Во текот на експериментот не беше постигната целосна регенерација на соматските ембриони во растенија.

Неколките добиени регенерирани растенија со корен немаа успешна аклиматизација во *in vivo* услови, што значи дека во иднина треба да се подобрат условите за аклиматизација на регенерираните растенија со цел да се добијат растенија што ќе се користат за понатамошна истражувачка и апликативна работа. Аклиматизацијата на регенерираните растенија беше стимулирана и со апликација на апсцизинска киселина (ABA) со цел да се намали транспирацијата и да се зголеми успешноста на адаптацијата на трансферот од *in vitro* во *in vivo*, но во овој случај не покажа повolen ефект.

Методите за работа и резултатите за култура на зиготски ембриони на касијата (*Prunus armeniaca* L.) во *in vitro* услови презентирани во овој труд се првични во Република Македонија, истите укажуваат на фактот дека се потребни долгорочни и дополнителни *in vitro* методи и молекуларни истражувања во комбинација со фитопатолошки анализи за да се добијат подетални резултати кои ќе имаат практична примена во земјоделското производство.

Користена литература

- [1] FAOSTAT Agriculture (2012). FAO statistical database. <http://www.fao.org/corp/statistics/en/> read on 12.11.2015.
- [2] Полјоделство, овоштарство и лозарство, 2014 (2015). Државен завод за статистика на Република Македонија, стр. 60.
- [3] Yildirim, H., Tilkat, E., Onay, A., Ozen, H.Ç. (2007). In vitro embryo culture of apricot, *Prunus armeniaca* L. cv. Nacihaliloğlu. International Journal of Science & Technology, 2(2), 99-104.
- [4] Karayiannis, I., Thomidis, T., Tsiftaris, A. (2008). Inheritance of resistance to Plum pox virus in apricot (*Prunus armeniaca* L.). Tree Genetics & Genomes, 4(2), 143-148.
- [5] Mitrev, S., Karov, I., Rusevski, R., Kostadinovska, E. (2012). Presence of Plum Pox virus in the Republic of Macedonia. Plant Protection Society of



- the Republic of Macedonia, 23(24/25), 35-40.
- [6] Mante, S., Scorza, R., Cordts, J. M. (1989). Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus cerasus*. Plant cell, tissue and organ culture, 19(1), 1-11.
- [7] Goffreda, J.C., Scopel, A. L., & Fiola, J. A. (1995). Indole butyric acid induces regeneration of phenotypically normal apricot (*Prunus armeniaca* L.) plants from immature embryos. Plant growth regulation, 17(1), 41-46
- [8] Pooler, M. R., Scorza, R. (1995). Regeneration of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] rootstock cultivars from cotyledons of mature stored seed. HortScience, 30(2), 355-356.
- [9] Lane, W.D., Cossio, F. (1986). Adventitious shoots from cotyledons of immature cherry and apricot embryos. Canadian journal of plant science, 66(4), 953-959.
- [10] Kukharchyk, N., & Kastrickaya, M. (2006). Embryo rescue techniques in *Prunus* L. breeding. Journal of fruit and ornamental plant research, 14, 129.
- [11] Ning, G. G., Bao, M. Z. (2007). Plant regeneration from callus derived from immature embryo cotyledons of *Prunus mume*. HortScience, 42(3), 744-747.
- [12] Nagaty, M. A. (2012). Establishment of regeneration system for Taif peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivar (balady cultivar) in Taif, KSA. J Am Sci, 8(4), 232-239.