

**СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
ИНСТИТУТ ПО ПОЛСКИ КУЛТУРИ - ЧИРПАН**

Веселина Ненова Баджелова

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ КЛОНАЛНОТО ИН ВИТРО
РАЗМНОЖАВАНЕ НА
МАСЛОДАЙНА РОЗА И ШИПКА**

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертация за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”**

Професионално направление 6.1. Растениевъдство

Научна специалност

**„Селекция и семепроизводство на
културните растения”**

**Научен ръководител:
Проф. д-р Виолета Божанова**

Дисертационната работа съдържа 129 страници, 19 фигури, 24 таблици и 38 снимки. Цитирани са 128 литературни източника, от които 39 на кирилица и 89 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на.....г. отчаса на заседание на.....

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в

1. ВЪВЕДЕНИЕ

За България е характерно богато биоразнообразие, включващо и голям брой етерично-маслени и лечебни култури. На първо място сред маслодайните култури, не само у нас, е прочутата по цял свят Казанлъшка маслодайна роза (*Rosa damascena* Mill. f. *Trigintipetala* Dieck).

За да бъде запазено водещото място на България в производството и търговията с розови продукти, е наложително да се съхрани генетичната автентичност на Казанлъшката маслодайна роза и да бъде запазено нашето розово масло в рамките на световния стандарт.

Към момента посадъчен материал от маслодайна роза у нас се получава основно чрез вкореняване на зелени резници в култивационни съоръжения - технология създадена в ИРЕМК през 1986г. Този метод има редица недостатъци, като основният е нисък процент на вкореняване, малък размножителен коефициент и много ръчен труд.

Тези проблеми могат да бъдат преодолен до голяма степен чрез използване на метода на клоналното микроразмножаване, който през последните години става все по-популярен като алтернатива на традиционните методи за вегетативно размножаване на рози.

Независимо че тъканно култивиране на роза е докладвано от много автори, процедури за масово производство на посадъчен материал за търговски цели при Казанлъшка маслодайна роза, *Rosa alba* и двата български сорта култивирана шипка не са публикувани до този момент, както у нас така и в света.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертацията е да бъдат проучени основни фактори, влияещи върху мултипликацията на растенията в *in vitro* условия и да бъдат разработени протоколи, за клонално микроразмножаване на маслодайна роза и култивирана шипка.

За постигане на тази цел се поставиха следните основни задачи:

1. Установяване вида на изходния експлант за въвеждане в култура.
2. Изследване на основни фактори, от които зависи клоналното микроразмножаване на подбрани произходи от *Rosa damascena* Mill. *Trigintipetala* Dieck. и *Rosa alba* L., с цел внедряване на метода в производството.
3. Проучване етапите на микроразмножаване при култивирана шипка.
4. Сравнително клонално размножаване на подобрена местна популация („Популация № 5^с“) на *Rosa damascena* Mill. с конвенционални и *in vitro* методи.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Хронология на експериментите

В периода 2014 – 2015 г. са проведени серии от експерименти, свързани с избора на подходящ изходен експлант, установяване на най-подходящите схеми за стерилизация и определяне на най-добрите варианти на хранителни среди за мултипликация и вкореняване. През 2016 г. са повторени опитите по клонално размножаване на изследваните генотипове с вече подбрани варианти и среди, за всеки от етапите на размножаването. През 2017 г. е проведен опит по сравнително клонално размножаване на подобрена местна популация („Популация №5“) на *Rosa damascena* Mill. с конвенционален и *in vitro* метод.

3.2. Растителен материал

Като обект на работа са включени три вида от семейство *Rosaceae*, а от всеки вид са подбрани по 2 генотипа.

- (*Rosa damascena* Mill. f. *Trigintipetala* Dieck)

Изследвани са два представителя на *Rosa damascena* Mill. :- „Популация №5“ с лабораторен номер (R3) и сорт „Елейна“ с лабораторен номер (R3-4).

- (*Rosa alba* L.)

След прецизна селекционна оценка, са изолирани два перспективни клона от популацията (R2-1 и R2-2)

- (*Rosa canina*; *Rosa webbiana* L.; *Rosa cinnamomea* L.)

Подбрани са два български сорта култивирана шипка, които са с доказани стопански Сорт „Вебецина 115“ е отбелязан с лабораторен номер (R1-1), а сорт „Пловдив1“ - с лабораторен номер (R1)

3.3. Избор на експлант (или отглеждане на донорни растения)

В култура са въвеждани аксиларни и апикални пъпки и нодални сегменти с прилежащите аксиларни пъпки. Проучен е потенциалът за индукция и пролиферация на експлантите, отделени от различни части на донорните растения:- средната част на едногодишен прираст, прираст от предварително изрязани до основата стари храсти, двугодишна дървесина и прираст от заложили за вкореняване зелени резници. Изследван е оптималният момент за отделяне на експлантите от майчиното растение и въвеждането им в култура (начало на вегетация, вегетация, покой).

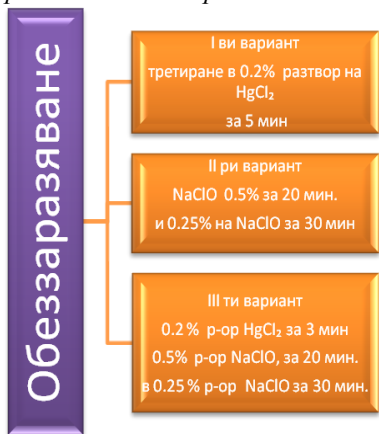
3.4. Микроразмножаване.

3.4.1. Обеззаразяване на експлантите.

Изпитани са три варианта на обеззаразяване, като експлантите предварително се обработват с 70% етилов алкохол (C₂H₅OH) за 1 мин. на магнитна бъркалка

ка (фиг. 1). Най-добрият вариант на дезинфекция е определен като отношение на живи чисти експланти към общия брой заложили експланти.

Фиг. 1 Варианти на обеззаразяване

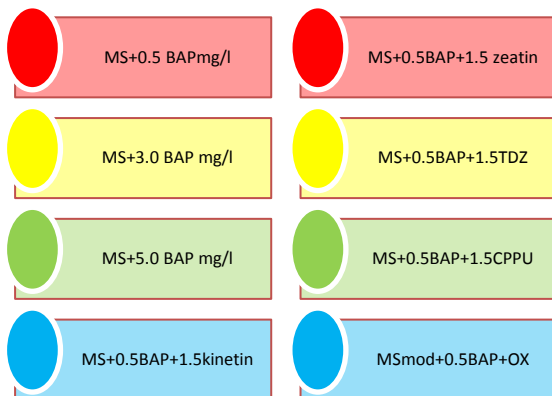


3.4.2. Пролиферация и мултипликация

Обеззаразеният растителен материал се нарязва на сегменти с дължина 1.0-1.5 см., с една до две прилежащи аксиларни пъпки, непосредствено преди поставяне на хранителна среда за пролиферация.

Хранителната среда за индукция и пролиферация е MS (Murashige and Skoog, 1962), без добавени хормони. Средата е втвърдена с Агар 6 g/L., а pH е фиксирано на 6.0 преди стерилизация, която протича при 121 °C на 1.1 atm. за 20 мин. Обеззаразените живи експланти, 20 дни след въвеждане в култура, са прехвърлени на среди за мултипликация.

Фиг. 2 Среди за мултипликация



Проучени са 8 варианта на хранителна среда за мултипликация, като основната е MS с добавени различни растежни регулатори от групата на цитокинините в различни концентрации и комбинации (фиг.2). Живите чисти експлантите са поставяни по 4 бр. в затворени стъклени съдове. Опитът е проведен по пълна рандомизирана блокова схема в две повторения, с по 5 буркана от вариант за всеки генотип с по 4 експланта в буркан. Здравите и развити експлантите се прехвърлят на свежа среда през 4 седмици.

3.4.3. Коренообразуване и аклиматизация

Използвани са два варианта за коренообразуване: *in vitro* и *ex vitro* (фиг.3).

Фиг.3 Варианти на вкореняване



Първи вариант - една част от регенерантите са поставени на среди за вкореняване в *in vitro* условия. Средата за вкореняване е MS основна с добавени различни растежни регулатори от групата на ауксините в ниска концентрация от 0.1mg/l и вариант без хормони.

Втори вариант - друга част от регенерантите са поставени директно в торопочвена смес 1:1 /перлит : торф/, без да преминават през среда за коренообразуване. Преди поставяне за вкореняване регенерантите се потапят в разтвор на IBA- 0.1 mg/L за 1 мин. при леко разклащане на съда, в който се третираат. Експериментът е проведен по пълна рандомизирана блокова схема в две повторения. Всяко повторение се състои от 10 стъклени съда/саксии с торопочвена смес, като всеки стъклен съд съдържа 4 регенеранта.

Процесът на коренообразуване е проследен за период от 3-4 седмици.

След *in vitro* вкореняване младите растения се адаптират в затворена оранжерия при условия на висока влажност 80-90% и температура 30-32°C, за период от 20 дни. Следва период на закаляване, при който температурата и

влажността постепенно се намаляват и оранжерията се открива. При вариант директно вкореняване, адаптацията на младите растения протича паралелно с процеса на вкореняване в култивационното съоръжение.

3.5. Сравнително клонално размножаване на Казанлъшка маслодайна роза с конвенционални и ин витро методи.

3.5.1. Метод на зелените резници

Опитът е заложен по утвърдената в ИРЕМК технология. За направа на резници е използван вегетативен материал от „Популация №5“ на *Rosa damascena Mill.* Растителният материал се нарязва на резници с дължина 10-12 см. Непосредствено преди поставяне в субстрата на култивационното съоръжение резниците са третирани с коренов стимулант (0,1 mg/l ИВА). Опитът е заложен в контейнери с почвен субстрат върху предварително оформени лехи, като са изработени 40 бр. резници в три повторения.

Изваждането на вкоренените розички е извършено ръчно през есента - месец октомври. Окачествяването и сортирането на розичките е направено съгласно изискванията на БДС (ОН 1882321-88).

3.5.2. Метод на клоналното микроразмножаване.

Използван е *in vitro* материал от „Популация №5“ на *Rosa damascena Mill.* Експлантите са аксиларни прорастъци. Те са поставяни директно на хранителна среда за мултипликация. Средата е (MS+ 3.0 mg/l ВАР). Тя е втвърдена с Агар 6 g/L., а рН е фиксирано на 6.0 преди стерилизация, която протича при 121°C на 1.1 atm. за 20 мин. Използвани са 40 бр. експланта, разположени в 5 буркана (по 8 експланта в буркан) в три повторения. Експлантите са култивирани за период от 35 дни. В края на периода е отчетен общият брой на формираните аксиларни прорастъци и среден брой прорастъци от буркан. Всички регенеранти са превърляни директно в торопочвена смес 1:1 /перлит:торф/, без да преминават през среда за коренообразуване.

3.6. Статистическа обработка на получените резултати

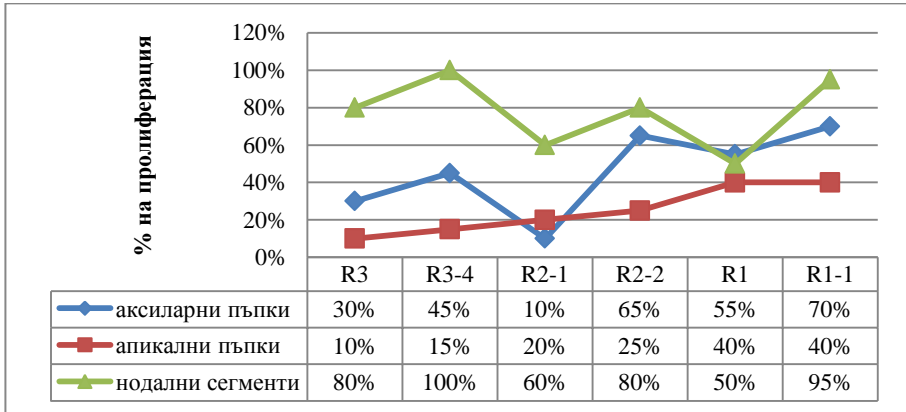
Всички експериментите са проведени по пълна рандомизирана блокова схема в две и повече повторения. Данните са анализирани чрез дисперсионен анализ ANOVA. Различията между отделните варианти на хранителни среди са установени с помощта на множествения тест за достоверност на разликите по Дънкан. Статистическите анализи и графичното представяне на получените резултати са направени с помощта на софтуерния пакет Statistica 8.0 (StatSoft, Inc. 2002).

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Влияние на вида на изходния експлант върху пролиферацията *in vitro* за всички изследвани генотипове

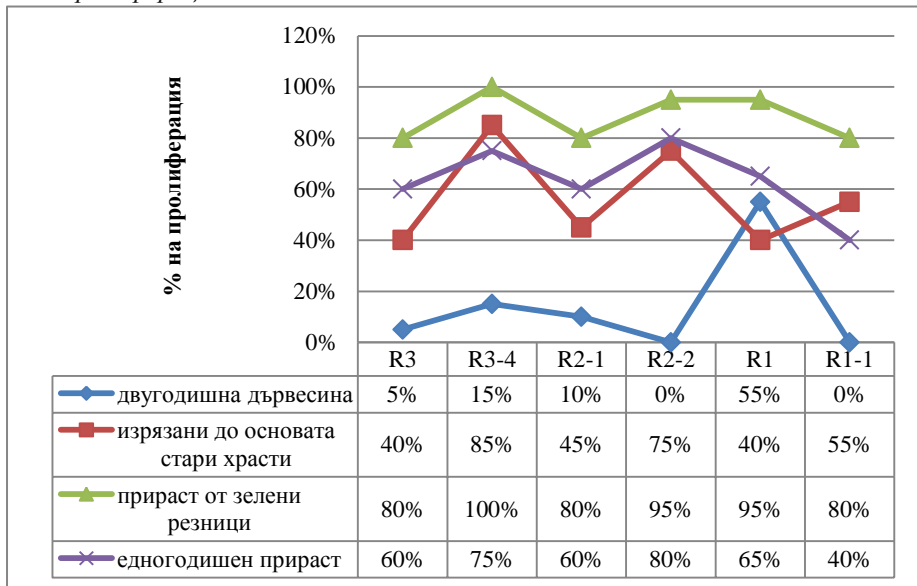
Резултатите от сравнителното въвеждане в култура на трите вида експлантите – аксиларни пъпки, апикални пъпки и нодални сегменти върху пролиферацията са представени на фиг. 4.

Фиг. 4 Влияние на вида на експланта и генотипа върху *in vitro* пролиферацията на изследваните видове и генотипове.



При всички изследвани видове най-голям процент от експлантите продължават да се развиват при *in vitro* условия и пролиферират, когато в култура се въвеждат нодални сегменти. Процентът на пролиферация варира от 90 % при *Rosa damascena* (средно от двата използвани генотипа) до 70 % при бялата роза. При въвеждане на аксиларни пъпки в култура процентът на пролифериращите експлантите варира от 65 % при шипка до 34. 4 % при бяла маслодайна роза. Най-слабо се развиват при *in vitro* условия апикалните пъпки, като процентът на пролифериращите експлантите варира от 40 % при бялата роза и шипката (средно от двата генотипа) до 12.5 % при *Rosa damascena*. В култура са въведени експлантите получени от различни части на донорните растения:- двугодишна дървесина, изрязани до основата стари храсти, прираст от зелени резници и експлантите получени от средната част на едногодишен прираст от цветодаващи храсти.

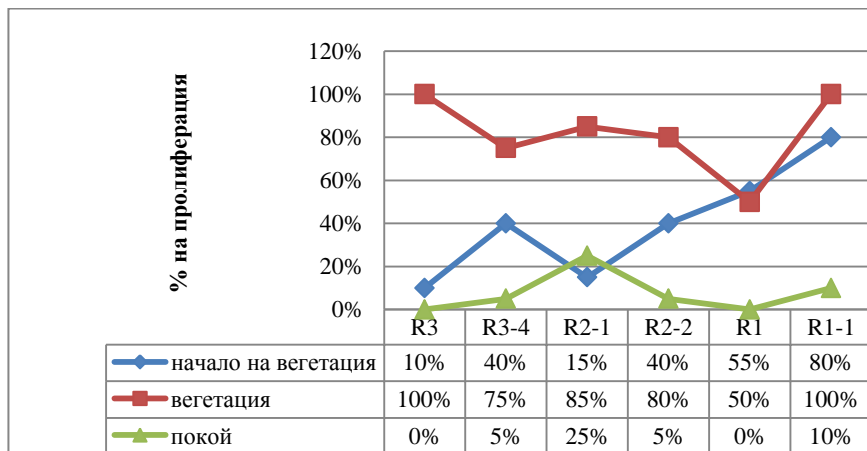
Фиг. 5 Влияние на възрастта и вида на донорните растения върху *in vitro* пролиферацията.



Всички изследвани генотипове проявяват много по-висок процент на индукция и пролиферация (80-100%), когато за изходен експлант е използван младият прираст на заложен за вкореняване зелени резници в култивационно съоръжение (фиг. 5). Незначителен процент от експлантите, получени от двугодишна дървесина, продължават своето развитие в *in vitro* условия. Процентът на мъртви, неразвити експлантите при маслодайната роза е от 85% до 100% при R2-2. При шипката е значително по-нисък, като за R1 е 55%, но при R1-1 отново достига 100% мъртви неразвити експлантите. Младият едногодишен прираст, който е добре оводнен и свеж, също проявява добър индукционен потенциал.

Изследван е потенциалът за индукция и пролиферация в различни етапи от физиологичното развитие на донорните растения. Резултатите показват, че периодът на активна вегетация е единственият подходящ момент за въвеждане в култура при маслодайна роза. Изключение прави генотип R1 (шипка сорт „Пловдив1“), при който началото на вегетация се оказва също подходящ момент за въвеждане в култура.

Фиг 6. Влияние на момента за въвеждане на експлантите в култура върху *in vitro* пролиферацията.



От проведеното изследване можем да обобщим, че най-добри резултати са отчетени при растителен материал, получен от прираст на заложен за вкореняване зелени резници в култивационно съоръжение. Времето за въвеждане в култура е юли месец в период на активна вегетация на донорните растения. Отделените апикални или акселарни пъпки нямат индукционния потенциал на нодален сегмент.

4.2. Изследвания върху клоналното *in vitro* размножаване на маслодайна роза (*Rosa damascena Mill.*) /2015 г./

4.2.1. Влияние на обеззаразяването върху чистотата на експлантите при маслодайна роза

Представените в табл. 1 резултати показват, че най-голям процент чисти от патогени и жизнени експлантите и при двата изследвани генотипа, съответно - 72.5 % при генотип R3 и 80 % при R3-4, са получени на трети вариант от изследването, при който са комбинирани и двата дезинфектанта - 0,2% разтвор на HgCl₂ за 3 мин + 0,5% разтвор на NaClO за 20 мин. и 0,25% NaClO за 30 мин. При третиране с 0.2% разтвор на HgCl₂ за 5мин. (първи вариант) голям процент от експлантите - 70% при генотип R3 и 87.5 % при R3-4 не понасят процеса на дезинфекция и загиват. Вторият вариант на обеззаразяване също е неефективен и голяма част от експлантите са заразени – 80% при генотип R3 и 87.5 % при клон R3-4.

Таблица 1. Варианти на обеззаразяване

Вариант на обеззаразяване	Генотип/ популация/	Заложени експланти бр.	Живи, чисти експланти		Загинали експланти	
			бр.	%	бр.	%
1. 0.2% разтвор на HgCl ₂ за 5 мин.	R3	40	12	30	28 [#]	70
	R3-4	40	5	12.5	33 [#] 2*	87.5
Общо за вариант 1		80	17	21.25	63	78.75
2. 0.5% разтвор на NaClO за 20 мин. и 0.25% за 30 мин.	R3	40	8	20	32*	80
	R3-4	40	5	12.5	35	87.5
Общо за вариант 2		80	13	16.25	67	83.75
3. 0.2% разтвор на HgCl ₂ за 3 мин + 0.5% разтвор на NaClO за 20 мин. и 0.25% за 30 мин.	R3	40	29	72.5	8 [#] 3*	27.5
	R3-4	40	32	80	8 [#]	20
Общо за вариант 3		80	61	76.25	19	23.75

(*) мъртви заразени / (#) мъртви от дезинфектанта

4.2.2. Влияние на вида и концентрацията на растежните регулатори върху процеса на мултипликация.

След около 4 седмици след прехвърляне на средата за мултиплициране, нодалните експланти, съдържащи латерални пъпки образуваха адвентивни прорастъци при всички използвани варианти на хранителна среда и при двата генотипа.

Наблюдавано е вариране в степента на мултипликация, изразена чрез процента на реагиралите експланти, общия брой на получените адвентивни прорастъци и броя на микро-прорастъците, получени от един експлант. От представените в табл. 2. резултати се вижда, че най-висок процент намножени експланти, както и най-голям брой адвентивни прорастъци на експлант и при двата генотипа са получени на вариантите на среда (1) и (2), които съдържат само един растежен регулатор ВАР (бензиламинопурин) в концентрация от 0,5 до 3.0 mg/ l.

Общият брой на получените микро-прорастъци средно от двата генотипа не се различава съществено при двете най-ниски концентрации на BAP – 65.5 бр. на варианти 1 и 66. 5 бр. на вариант 2. С повишаване на концентрацията на BAP в хранителната среда до 5.0 mg/l общият брой на формираните аксиларни прорастъци започва да намалява до 50 бр. средно за двата генотипа.

При комбиниране на ниска концентрация BAP с други цитокинини – Kinetin, Zeatin, Thidiazuron и CPPU (варианти 4, 5, 6 и 7) степента на мултипликация е по-ниска – от 39.5 бр. (средно от двата генотипа) при вариант 4 (комбинация между 0.5 mg l/1 BAP и 1.5 mg/l kinetin) до 18 бр. при вариант 7 (комбинация между 0.5 mg/l BAP и 0.5 CPPU mg/l).

Таблица 2 Изпитване влиянието на различни по вид и концентрация растежни регулатори върху процеса на мултипликация.

Вариант на средата за мултипликация	Реагирани експлант %		Общ брой формиращи микро-прорастъци		Среден брой прорастъци на експлант	
	Генотип R3	Генотип R3/4	Генотип R3	Генотип R3/4	Генотип R3	Генотип R3/4
1. MS+ 0.5 BAP mg/L	95	95	73 ^a	58 ^b	3,84	3,05
2. MS+ 3.0 BAP mg/L	100	100	66 ^a	67 ^a	3,3	3,35
3. MS+ 5.0 BAP mg/L	100	90	53 ^{bc}	47 ^c	2,65	2,6
4. MS+ 0.5 BAP+1,5 kinetin mg/L	85	85	47 ^c	32 ^d	2,77	1,89
5. MS+ 0.5 BAP+1.5 zeatin mg/L	85	80	26 ^{de}	28 ^d	1,45	1,75
6. MS+ 0.5 BAP+1.5 TDZ mg/L	75	85	26 ^{de}	32 ^d	1,73	1,88
7. MS+ 0.5 BAP+0.5 CPPU mg/L	55	55	19 ^{ef}	17 ^f	1,73	1,55

8. MS mod+ 0.5 BAP+OX	55	45	16 ^f	18 ^{ef}	1,46	2,0
--------------------------	----	----	-----------------	------------------	------	-----

Забележка: (ох) - витамин С и лимонена киселина по 50 mg/L ;

CPPU, N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea

Таблица 3 Анализ на варианса на влиянието на изследваните фактори върху варирането на общия брой на мултиплицираните адвентивни прорастъци

Източник на вариране	df	SS	MS	F	Сила на влияние %
Генотип	1	91.13	91.13**	6.750	0.78
Среда	7	10994.88	1570.7***	116.35	93.6
Взаимодействие	7	443.88	63.41*	4.69	3.78
Грешка	16	216	13.50		

*** Significant at $p < 0.001$

Проведеният анализ на варианса, представен на табл. 3 показва, че генотипът, вариантите на хранителната среда за мултипликация и взаимодействието между тях оказват статистическо достоверно влияние върху варирането на мултипликацията на експлантите, изразено чрез общия брой на индуцираните адвентивни прорастъци. Варирането в общия брой на индуцираните адвентивни прорастъци се дължи в най-голяма степен на вариантите на хранителната среда, като на него се пада 93.6 % от общото вариране.

4.2.3 Влияние на растежните регулатори и условията *in vitro*, *in vivo* / върху процеса на вкореняване.

Резултатите, представено на таблица 4 показват, че при *in vitro* условия процесът на вкореняване протича най-добре при добавяне в средата на ИВА и са получени най-голям % вкоренени растения - 95 % (средно от двата генотипа). Най-нисък е процентът на вкоренени растения на средата с IAA – 61.25 %. На средата без добавка на растежни регулатори се получават задоволителни резултати – 67.5 % вкоренени растения.

Най-голям % успешно вкоренени млади растения са получени при директно вкореняване в торфено-почвена смес – 97.5 % (средно за двата генотипа).

Таблица 4 Влияние на растежните регулатори и условията върху вкореняването на *ин витро* регенерираните растения

Условия за вкореняване / растежни регулатори	Брой заложени регенеранти	Вкоренени експланти бр.		Ефективност на вкореняването %	
		R3	R3-4	R3	R3-4
<i>in vitro</i>					
1.MS- без хормони	40	22	32	55	80
2.MS+0.1mg/L IBA	40	36	40	90	100
3. MS+0.1mg/L IAA	40	18	31	45	77.5
4. MS+0.1 mg/LNAA	40	31	28	77.5	70
<i>ex vitro</i>					
5. Торо-почвена смес	40	40	38	100	95
Общо за генотипа	200	147	169	73,5	84.5

4.3. Изследвания върху клоналното *ин витро* размножаване на (*Rosa alba*) /2015г./

4.3.1. Влияние на обеззаразяването върху чистотата на експлантите при бяла маслодайна роза

От проведеното изследване и резултатите, отразени в табл. 5 се вижда, че най-голям процент живи и чисти от патогени и жизнени експланти и при двата изследвани генотипа, съответно - 75% при клон R2-1 и 90% при клон R2-2, са получени отново на трети вариант от третиранията, при който са комбинирани и двата дезинфектанта.

Таблица 5 Варианти на обеззаразяване

Вариант на обеззаразяване	Генотип/ клон/	Заложени експланти брой	Живи, чисти експланти		Загинали експланти	
			брой	%	брой	%
1. 0.2% разтвор на HgCl ₂ за 5 мин.	R2-1	40	10	25	30 [#]	75

	R2-2	40	2	5	37 [#] 1*	95
Общо за вариант 1		80	12	15	68	85
2. 0.5% разтвор на NaClO за 20 мин. и 0.25% за 30 мин.	R2-1	40	6	15	34 *	85
	R2-2	40	8	20	32*	80
Общо за вариант 2		80	14	17.5	66	82.5
3. 0.2% разтвор на HgCl ₂ за 3 мин + 0.5% разтвор на NaClO за 20 мин. и 0.25% за 30 мин.	R2-1	40	30	75	9 [#] 1*	25
	R2-2	40	36	90	4 [#]	10
Общо за вариант 3		80	66	82.5	14	17.5

(*) мъртви заразени / (#) мъртви от дезинфектанта

4.3.2. Влияние на вида и концентрацията на растежните регулатори върху процеса на мултипликация.

Четири седмици след прехвърляне на средата за мултиплициране нодалните експлантати образуваха адвентивни прорастъци при всички използвани варианти на хранителна среда и при двата генотипа бяла маслодайна роза. Беше наблюдавано вариране в степента на мултипликация, изразена чрез процента на реагирали експлантати, общия брой на получените адвентивни прорастъци и броя на формираните микропрорастъци, получени от един експлант (табл. 6). Най-голям брой експлантати реагират с мултипликация, най-голям общ брой адвентивни прорастъци и най-голям брой адвентивни прорастъци на един експлант и при двата изследвани генотипа се получават отново на вариантите на среда 1, 2 и 3, които съдържат само един растежен регулатор ВАР - 6-Benzylaminopurine в концентрация от 0.5 до 5.0 mg/l. При комбиниране на ниска концентрация ВАР с други цитокинини – Kinetin, Zeatin, Thidiazuron и CPPU (варианти 4, 5, 6 и 7) степента на мултипликация е по-ниска – от 31.5 бр. при вариант 5 (комбинация между 0.5 mg/l ВАР и 1.5 mg/l zeatin) до 45.5 бр. при вариант 6 (комбинация между 0.5 mg l-1 ВАР 1.5 mg/l TDZ). Генотип R2-1 реагира по-добре от генотип R2-2 на вариантите на средите, съдържащи комбинация от ВАР и TDZ (вариант 6) и ВАР и CPPU (вариант 7), като общият брой получени прорастъци се доближава до тези, получени на най-добрите варианти на среди, съдържащи само ВАР (вариант 1 и 2). Средният брой на адвентивните прорастъци на един експлант дори е по-висок, но за сметка на по-ниския процент реагирали експлантати. Най-ниска е степента на мултипликация (21.5 общ брой адвентивни про-

растъци) при вариант (8), който се различава от вариант (1) само по добавените в средата антиоксиданти.

Таблица 6. Изпитване влиянието на различни по вид и концентрация растежни регулатори върху процеса на мултипликация.

Варианти на средата за мултипликация	Реагирали експланти %		Общ брой формиращи микро-прорастъци		Среден брой прорастъци на експлант	
	Генотип R2-1	Генотип R2-2	Генотип R2-1	Генотип R2-2	Генотип R2-1	Генотип R2-2
1. MS+ 0.5 BAP mg/L	100	95	67	65	3.35	3.4
Means	97.5		66 ^a		3.38	
2. MS+ 3.0 BAP mg/L	85	90	68	60	4.0	3.3
Means	87.5		64 ^a		3.65	
3. MS+ 5.0 BAP mg/L	100	95	45	47	2.25	2.47
Means	97.5		46 ^b		2.36	
4. MS+ 0.5 BAP+1,5 kinetin mg/L	85	85	46	40	2.7	2.35
Means	85		43 ^b		2.5	
5. MS+ 0.5 BAP+1.5 zeatin mg/L	80	80	38	25	2.37	1.56
Means	80		31.5 ^{bc}		1.97	
6. MS+ 0.5 BAP+1.5 TDZ mg/L	75	80	62	29	4.4	1.8
Means	77.5		45.5 ^b		3.1	

7. MS+ 0.5 BAP+0.5 CPPU mg/L	50	55	53	17	5.3	1.55
Means	52.5		35 ^{bc}		3.43	
8. MS mod+ 0.5 BAP+OX	55	60	14	29	1.3	2.41
Means	57.5		21.5 ^c		1.86	

Забележка: (ox) - витамин С и лимонена киселина по 50 mg/L;
CPPU, N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea

Проведеният анализ на варианса, представен на табл. 7 показва, че генотипът, вариантите на хранителната среда за мултипликация и взаимодействието между тях оказват статистическо достоверно влияние върху варирането на изследвания признак. Наблюдаваното вариране в броя на индуцираните прорастъци се дължи в най-голяма степен на хранителната среда. На нея се падат 68% от общото вариране на признака, следвана от взаимодействието между генотипа и средата с 21.5% от общото вариране. Двата генотипа се различават до известна степен по отношение на способността си за мултиплициране при *in vitro* условия, като генотип R2-1 показва малко по-добра реакция при 5 от изследваните варианти на хранителна среда (табл. 6). Различните реакции на клоновете към някои от изпитваните варианти на среди е проява на настъпващото взаимодействие между двата фактора, което се потвърждава и от проведенния анализ на варианса.

Таблица 7 Анализ на варианса на влиянието на изследваните фактори върху общия брой на мултиплицираните адвентивни прорастъци

Източник на вариране	df	SS	MS	F	Сила на влияние %
Генотип	1	820.12	820.12***	69.063	8.53
Среда	7	6538.88	934.13***	78.663	68.0
Взаимодействие	7	2066.87	295.27***	24.865	21.5
Грешка	16	190.00	11.87		

4.3.3. Влияние на растежните регулатори и условията /in vitro, in vivo / върху процеса на вкореняване.

Таблица 8 Влияние на растежните регулатори и условията върху вкореняването на *in vitro* регенерираните растения

Условия за вкореняване/ растежни регулатори	Брой заложени регенеранти	Вкоренени експланти бр.		Ефективност на вкореняването %	
		R2-1	R2-2	R2-1	R2-2
<i>in vitro</i>					
1.MS- без хормони	40	26	32	65	80
2.MS+0.1mg/L IBA	40	32	36	80	90
3.MS+0.1mg/L IAA	40	28	31	70	77.5
4.MS+0.1 mg/L NAA	40	29	25	72.5	62.5
<i>ex vitro</i>					
5.Торо-почвена смес	40	40	38	100	95
Общо за генотипа	200	155	166	77.5	83

Резултатите, представени на табл. 8 показват, че при *in vitro* условия процесът на вкореняване при бяла маслодайна роза протича най-добре при добавяне в средата на IBA и са получени най-голям процент вкоренени растения - 85% (средно от двата генотипа). Най-нисък е процентът на вкоренени растения при използване на NAA – 67.5%. При *in vitro* вкореняване са получени сравнително добри резултати и върху среда без добавка на растежни регулатори – 72.5% вкоренени растения. Най-голям процент успешно вкоренени млади растения са получени при директно вкореняване в торо-почвена смес – 97.5% средно за двата генотипа. Всички вкоренени растения са жизнени и с добре развита коренова система с необходимата дължина и маса.

Двата генотипа бяла маслодайна роза не се различават съществено по способността си за вкореняване, като генотип R2-2 превъзхожда недоказано статистически генотип R2-1. При него са вкоренени успешно 83% от всички регенеранти на различните среди и при различните условия, докато при R2-1 – 77.5% (общо за генотипа).

4.4. Изследвания върху клонално ин витро размножаване на култивирана шипка /20015г./

4.4.1. Влияние на обеззаразяването върху чистотата на експлантите при двата сорта култивирана шипка

Представените в табл. 9 резултати показват, че най-голям процент чисти от патогени и жизнени експлантите и при двата изследвани сорта култивирана шипка, съответно – 75% при генотип R1 и 85% при R1-1 са получени на трети вариант от изследването, при който са комбинирани и двата ползвани дезинфектанта.

Таблица 9 Варианти на обеззаразяване

Вариант на обеззаразяване	Генотип /сорт /	Заложени експлантите брой	Живи, чисти експлантите		Загинали експлантите	
			брой	%	брой	%
1. 0.2% разтвор на HgCl ₂ за 5 мин.	R1	40	8	20	32 [#]	80
	R1-1	40	4	10	35 [#] 1*	90
Общо за вариант 1		80	12	15	68	85
2. 0.5% разтвор на NaClO за 20 мин. и 0.25% за 30 мин.	R1	40	4	10	36 *	90
	R1-1	40	8	20	32*	80
Общо за вариант 2		80	12	15	68	85
3. 0.2% разтвор на HgCl ₂ за 3 мин + 0.5% разтвор на NaClO за 20 мин. и 0.25% за 30 мин.	R1	40	30	75	9 [#] 1*	25
	R1-1	40	34	85	6 [#]	15
Общо за вариант 3		80	64	80	16	20

(*) мъртви заразени / (#) мъртви от дезинфектанта

При третиране с 0.2% разтвор на HgCl₂ за 5мин. (първи вариант) голям процент от експлантите - 80% при генотип R1 и 90% при R1-1 не понасят процеса на стерилизация и загиват. Вторият вариант на обеззаразяване също е неефективен и голяма част от експлантите са заразени – 90% при генотип R1 и 80 % при генотип R1-1.

4.4.2. Влияние на вида и концентрацията на растежните регулатори върху процеса на мултипликация.

Обеззаразените и жизнени експланти, след пролиферация на аксиларните пъпки са прехвърлени на среди за мултипликация. Видимо удължаване на подалните сегменти върху средата за индукция се наблюдаваше в рамките на 10-20 дни.

След около 3-4 седмици след прехвърляне на средата за мултиплициране подалните експланти образуваха адвентивни прорастъци с различен брой и дължина за различните варианти на хранителна среда.

Таблица 10 Изпитване влиянието на различни по вид и концентрация растежни регулатори върху процеса на мултипликация.

Варианти на средата за мултипликация	Реагирали експланти %		Общ брой формиращи микропрорастъци		Среден брой прорастъци на експлант	
	Генотип R1	Генотип R1/1	Генотип R1	Генотип R1/1	Генотип R1	Генотип R1/1
1. MS + 0.5 BAP mg/L	95	100	63 ^a	64 ^a	3.32	3.2
2. MS + 3.0 BAP mg/L	90	90	53 ^b	47 ^{bc}	2.95	2.6
3. MS + 5.0 BAP mg/L	80	95	38 ^{de}	45 ^{cd}	2.24	2.37
4. MS - 0.5 BAP + 1,5 kinetin mg/L	85	80	39 ^{de}	36 ^{ef}	2.29	2.25
5. MS + 0.5 BAP + 1.5 zeatin mg/L	85	85	35 ^{ef}	29 ^{fg}	2.06	1.71
6. MS + 0.5 BAP+1.5 TDZ mg/L	75	85	26 ^{gh}	41 ^{cde}	1.73	2.41
7. MS + 0.5 BAP + 0.5 CPPU mg/L	70	60	29 ^{fg}	23 ^{gh}	2.07	1.92
8. MS mod + 0.5 BAP+OX	55	80	20 ^h	35 ^{ef}	1.8	2.19

Забележка:

(ox) - витамин С и лимонена киселина по 50 mg/L
CPPU, N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea

Резултатите, които бяха отчетени за двата изследвани генотипа култивирани на шипка, по отношение на степента на мултипликация, не се различават съществено от резултатите получени за останалите изследвани видове рози. Най-добра мултипликация и при двата генотипа е получена на среда (1) ($MS+ 0.5 \text{ ВАР mg/l}$) - 63 бр. общо формирани микро- прорастъци за генотип R1 и 64 бр. за генотип R1-1 (табл. 10). На тази среда са получени и по-висок брой експлантанти реагирани с мултипликация (95% за R1 и 100% за R1-1), както и по-голям брой микро-прорастъци върху един експлант, като това е по-ясно изразено при генотип R1 - 3.32 бр. Тези резултати, в незначителна степен, се отличават от резултатите получени при *Rosa damascena* и *Rosa alba*.

Таблица 11 Анализ на варианса на влиянието на изследваните фактори върху общия брой на мултиплицираните адвентивни прорастъци

Източник на вариране	df	SS	MS	F	Сила на влияние %
Генотип (G)	1	36.13	36.13	3.803	0.69
Среда (M)	7	4440.88	634.41***	66.78	85.23
Взаимодействие (GXM)	7	580.88	82.98***	8.74	11.15
Грешка	16	152.0			

*** Significant at $p < 0.001$

Анализът на варианса (табл. 11) показва, че вариантите на средата за мултипликация и взаимодействието между двата изследвани фактора (среда и генотип), оказват статистически достоверно влияние върху варирането на мултипликацията на експлантите, изразена чрез общия брой на регенерираните аксиларни прорастъци. Промяната на общия брой на индуцирани прорастъци се дължи в най-голяма степен на вида на хранителната среда (85.23%), следвана от взаимодействието между двата изследвани фактора (11.15%). Генотипът в случая има незначително влияние, по-малко от 1% съответно (0.69%), върху силата на мултиплициране. Този процент е значително по-нисък от полуеният при *Rosa alba* (8.53%) и малко по-нисък от *Rosa damascena* (0.78%). От тук можем да заключим, че в сравнение с останалите изследвани видове рози, мултипликацията на двата сорта шипка зависи в най-малка степен от генотипа.

4.4.3. Влияние на растежните регулатори и условията *in vitro*, *in vivo* / върху процеса на вкореняване.

Когато етапът на коренообразуване преминава в *in vitro* условия най-добри резултати съответно 77.5% за R1 и 87.5% за R1-1 са получени на среда (2) с добавена ИВА в концентрация (0.1mg/l). Получените резултати показват, че и шипката се вкоренява много добре директно в почва, а получената коренова

система отговаря на стандарта. Процентът на вкоренените растения за генотип R1 достига 97.5% , а за генотип R1-1- 100%. Тези резултати значително надвишават резултатите, получени при всички варианти на вкореняване при *in vitro* условия.

Таблица 12 Влияние на растежните регулатори и условията върху вкореняването на *in vitro* регенерираните растения

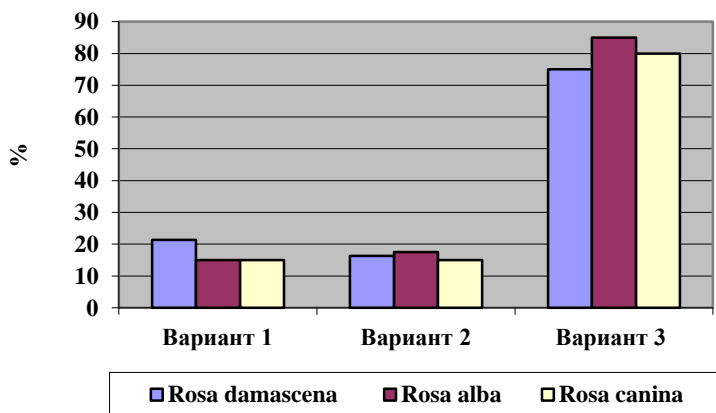
Условия за вкореняване / растежни регулатори	Заложени регенеранти бр.	Вкоренени експланти бр.		Ефективност на вкореняването %	
		R1	R1-1	R1	R1-1
<i>in vitro</i>					
1.MS - без хормони	40	24	30	60	75
2.MS + 0.1mg/L IBA	40	31	35	77.5	87.5
3.MS + 0.1mg/L IAA	40	26	28	65	70
4.MS + 0.1mg/L NAA	40	28	26	70	65
<i>ex vitro</i>					
5.Торо-почвена смес	40	39	40	97.5	100
Общо за генотипа	200	148	159	74	79.5

4.5. Сравнителна характеристика на процеса на размножаване за всички изследвани видове.

Извършено е сравняване на способността за клонално микроразмножаване между трите изследвани вида от семейство *Rosaceae* (средни резултати от генотиповете на всеки вид), като са проследени резултатите за всеки от етапите на размножаване.

4.5.1. Етап на дезинфекция

Фиг. 7 Сравняване на ефективността на обеззаразяването при изследваните видове



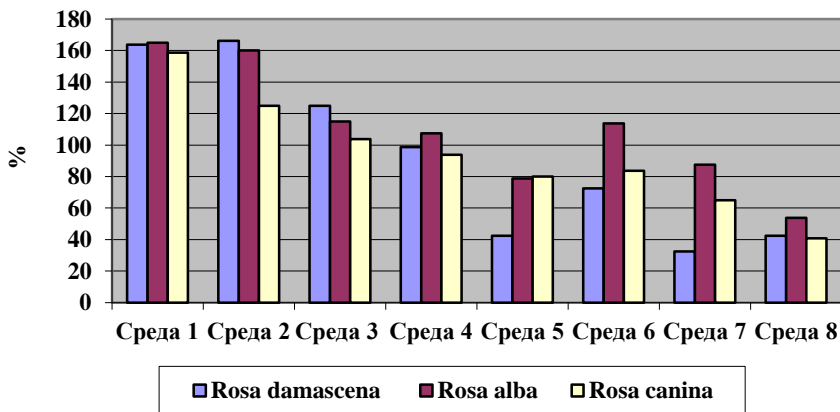
Ефективността на обеззаразяването е представена като % на чистите и живи експланти за съответния вариант на третиране (Фиг. 7). И при трите изследвани вида процесът на дезинфекция е най-ефективен при вариант (3), при който са комбинирани два дезинфектанта в следната последователност и време за третиране - 0.2% разтвор на $HgCl_2$ за 3 мин + 0.5% разтвор на $NaClO$ за 20 мин. и 0.25% за 30 мин. Варирането в броя на живите и чисти експланти между отделните видове е незначителен. Най-голям % живи и чисти експланти са получени при бялата маслодайна роза – 85%, следвана от шипката – 80%, а най-малък при *Rosa damascena* – 75%.

4.5.2. Етап на мултипликация

При всички изследвани видове рози най-голям брой експланти реагират с мултипликация, индуцирани са най-голям общ брой адвентивни прорастъци и най-много прорастъци върху един експлант на вариантите на среда (1, 2 и 3), които съдържат само един растежен регулатор ВАР - 6-Benzylaminopurine в концентрация от 0.5 до 5.0 mg/ l. (Фиг. 8). Общият брой на получените адвентивни прорастъци не се различава съществено между двата вида маслодайни рози при двете по-ниски концентрации на ВАР. При *Rosa damascena* са получени – 65.5 бр. при вариант (1) и 66 бр. при вариант (2), а при *Rosa alba* – 66 бр. при вариант (1) и 64 при вариант (2). При шипката също са индуцирани най-голям брой прорастъци на тези два варианта на среда, но техният брой е малко по-нисък в сравнение с двете маслодайни рози - 63.5 бр. при вариант (1) и 50 бр.

при вариант (2), като при шипката по-добрите резултати са получени на вариант (1) от изследването. На вариант (3), съдържащ най-висока концентрация на ВАР – 5.0 mg/ l, са получени малко по-ниски резултати и при трите вида, в сравнение с двата варианта (1 и 2) с по-ниски концентрации на този растежен регулатор. Отделните видове се различават несъществено по общия брой на мултиплицираните експланти, като най-много адвентивни прорастъка са получени при *Rosa damascena* – 50 бр., а най-малко – при двата сорта култивирана шипката – 41.5 бр.

Фиг. 8 Сравняване на ефективността на мултипликацията за отделните видове на среда с различен състав на растежните регулатори



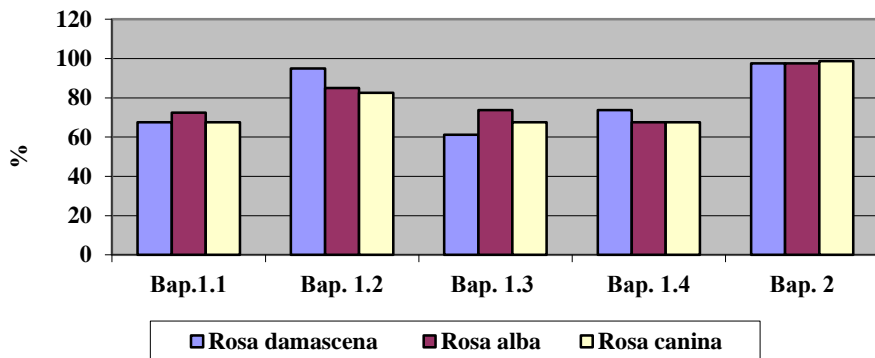
Бялата маслодайна роза е единственият вид, който реагира много добре на вариант (6) на средата (комбинация между 0.5 mg/ l ВАР 1.5 mg/ l TDZ), като общият брой индуцирани адвентивни прорастъка 45.5 се изравнява с този, получен на среда (3) 46 и превишава този, получен на среда (4) 43 бр.

4.5.3. Етап на вкореняване

На Фиг. 8 е представено в % (средно от генотиповете за всеки вид) отношението вкоренени млади растения към вариант на вкореняване. При всички изследвани видове на вариант (2), при който регенерантите се вкореняват при *ex vitro* условия са получени най-голям брой вкоренени растения - съответно по 39 броя (97.5%), за *Rosa damascena* и *Rosa alba* и малко по-висок 39.5 броя (98.5%), за култивираната шипка. При *in vitro* вкореняване най-добри резултати при всички изследвани видове са получени на вариант (1,2), при който към основната хранителна среда е добавена IBA- (MS+0.1mg/L IBA) - съответно 38 броя (95%) при *Rosa damascena*, 34 броя (85%) при *Rosa alba* и 33 броя (82%)

при шипката. Тези резултати са много близки до резултатите, получени при директното вкореняване при *ex vitro* условия.

Фиг. 9 Сравняване на ефективността на вкореняването при изследваните видове



4.6. Повторение на опита по клонално *ин vitro* размножаване на изследваните генотипове с вече подбрани варианти и среди /2016 г./

В резултат на проведените експерименти и направените анализи, беше предприето повторение на опита по клонално размножаване на проучваните видове рози, като бяха включени само тези варианти и среди, които демонстрираха най-добри резултати в предходните изследвания за всеки отделен етап на размножаването. Опитът продължи направо от етапа на мултипликация, защото вече разполагахме с достатъчно обеззаразен изходен *in vitro* материал.

4.6.1. Етап на мултипликация

От резултатите, представени в табл. 13 се вижда, че и трите използвани варианти демонстрират висок потенциал за мултипликация, като % на експлантите реагирани с мултипликация варира от 85 до 100 % за отделните варианти и генотипове. На среда (2) с добавка на 3.0 mg/l BAP най-голям процент от експлантите при всички изследвани генотипове реагират с мултипликация. Изключение прави генотипа култивирана шипка R1. На тази среда са индуцирани и най-голям общ брой аксиларни прорастъци – 414 бр. за всички използвани генотипове. На среда (1) общият брой на аксиларните прорастъци е по-нисък – 358 бр, а най-малък е той на среда (3) – 324 бр. Средният брой прорастъци на един експлант на среда (2) също е най-висок и варира от 3.2 при генотип R2-1 от *Rosa alba* до 3.8 при генотип R1-1 при шипката. Изключение прави генотип R1 от шипката, при които и двата изследвани показателя са с по-високи стойности

на среда (1). Най-малък общ брой аксиларни прорастъци са получени на среда (3) при всички изследвани генотипове – от 44 бр. при R3-4 от *Rosa damascene* до 63 при R2-2 от *Rosa alba*. На този вариант на среда са индуцирани и най-малък брой прорастъци на един експлант, който варира от 2.3 при генотип R1 от шипката до 3.15 при R2-2 от *Rosa alba*.

Тези резултати са в потвърждение на установеното в предходните раздели по мултипликация при изследваните видове и генотипове. Те показват, че хранителната среда за мултипликация - MS с добавка на 3.0 mg/l BAP е ефективна и може да бъде включен в протокола за клонално микроразмножаване при двата вида маслодайна роза и при култивираната шипка, което ще гарантира повторяемост на резултатите през различни години.

Таблица 13 Изследване влиянието на различна концентрация на BAP върху процеса на мултипликация.

Генотип	Варианти на средата за мултипликация	Брой заложен експлант	% експлант реагирали с мултипликация	Средно брой формирани аксиларни прорастъци
R3	1. MS + 0.5 BAP mg/L	20	95	2.70
	2. MS + 3.0 BAP mg/L	20	100	3.75
	3. MS + 5.0 BAP mg/L	20	100	2.85
R3-4	1. MS + 0.5 BAP mg/L	20	90	2.00
	2. MS + 3.0 BAP mg/L	20	95	3.40
	3. MS + 5.0 BAP mg/L	20	85	2.20
R2-1	1. MS + 0.5 BAP mg/L	20	95	3.55
	2. MS + 3.0 BAP mg/L	20	100	3.20
	3. MS + 5.0 BAP mg/L	20	90	2.75
R2-2	1. MS + 0.5 BAP mg/L	20	90	2.40
	2. MS + 3.0 BAP mg/L	20	100	3.35
	3. MS + 5.0 BAP mg/L	20	95	3.15
R1	1. MS + 0.5 BAP mg/L	20	100	3.60
	2. MS + 3.0 BAP mg/L	20	95	3.20
	3. MS + 5.0 BAP mg/L	20	90	2.35

R1-1	1. MS + 0.5 BAP mg/L	20	95	3.65
	2. MS + 3.0 BAP mg/L	20	95	3.80
	3. MS + 5.0 BAP mg/L	20	90	2.90

4.6.2. Етап на вкореняване

Резултатите в табл. 14 демонстрират успеха при вкореняване на получените регенеранти и при двата от изследваните варианти. Въпреки близките стойности, вариант (2) - *ex vitro* е с по-висок процент на вкореняване. Процентът на вкоренените растения при директно вкореняване в торопочвена смес варира от 95 % при генотип R3-4 до 100% при генотип R3 от *Rosa damascena* и двата генотипа шипка. Процентът на вкоренените растения при *in vitro* вкореняване варира от 70 % при R3-4 от *Rosa damascena* до 100 % при R1 от *Rosa canina*.

Тези резултати потвърждават проведените до момента експерименти. От това следва, че вкореняването на младите регенеранти директно в торопочвена смес, без да се прминава през *in vitro* среда, може да бъде включено в протокола по клонално микроразмножаване за всеки един от изследваните видове. Това ще позволи да бъде скъсена цялата процедура по размножаване и ще спести средства и време при производството на посадъчен материал от тези култури.

Таблица 14 Влияние на условията върху вкореняването на *in vitro* регенерираните растения

Генотип	Вариант на коренообразуване		Заложени регенеранти бр.	Вкоренени експланти бр.	Ефективност на вкореняването %
R3	Ин витро	MS + 0.1mg/l IBA	40	36	90
	Директно вкореняване	Торопочвена смес	40	40	100
R3-4	Ин витро	MS + 0.1mg/l IBA	40	28	70
	Директно вкореняване	Торопочвена смес	40	38	95
R2-1	Ин витро	MS + 0.1mg/l IBA	40	32	80

	Директно вкореняване	Торопочвена смес	40	39	97.5
R2-2	Ин витро	MS + 0.1mg/l IBA	40	35	87.5
	Директно вкореняване	Торопочвена смес	40	39	97.5
R1	Ин витро	MS + 0.1mg/l IBA	40	40	100
	Директно вкореняване	Торопочвена смес	40	40	100
R1-1	Ин витро	MS + 0.1mg/l IBA	40	36	90
	Директно вкореняване	Торопочвена смес	40	40	100

4.7. Сравнително клонално размножаване.

4.7.1. Конвенционален метод

За конвенционално размножаване на „Популация №5“ на *Rosa damascena* е използван „методът на зелените резници“, като са спазени всички необходими изисквания за всеки от етапите на технологията.

Представените резултати показват, че от общо заложените 120 зелени резници в три повторения успешно са вкоренени едва 45 от тях или 37.5 %, като този процент варира от 20 до 55 между отделните повторения (табл.15). След изваждането и сортиране на вкоренените розички, беше установено, че 84.4 % от всички вкоренени растения отговарят на изискванията на БДС и могат да се използват като посадъчен материал (табл. 16). В резултат на това може да се направи извода, че ефективността на метода на зелените резници е твърде ниска едва около 37 % от всички заложените резници се развиват до добре вкоренени малки розички, които могат да се използват като посадъчен материал съгласно изискванията на БДС.

Таблица 15 Вкореняване на зелени резници от „Популация №5“ на *Rosa damascena* с конвенционален метод

Генотип	Заложени резници		Вкоренени резници	
	Бр.		Бр.	%
повторение 1	40		8	20.00
повторение 2	40		15	37.50
повторение 3	40		22	55.00
Общо	120		45	37.50

Таблица 16 Вкоренени резници по БДС

Генотип	Вкоренени резници	Извън стандарта	Стандартни	Вкоренени стандартни рози
	Бр.	Бр.	Бр.	%
повторение 1	8	0	8	100
повторение 2	15	2	13	86.6
повторение 3	22	5	17	77.27
общо	45	7	38	84.4

4.7.2. Ин витро размножаване

Като изходни експланти са използвани микро прорастъци, получени при клоналното *in vitro* размножаване на изследвания генотип, като те са поставяни директно на хранителна среда за мултипликация.

Резултатите от клоналното микроразмножаване са представени в табл. 17. От общо заложени 120 изходни експланти са индуцирани 928 бр. аксиларни прорастъци т.е. около 7.73 бр. на един експлант. След прехвърляне на регенерантите директно в торопочвена смес при *ex vitro* условия 98.9 % от тях са вкоренени успешно т.е. получени са 918 бр. млади вкоренени розички.

Таблица 17 Клонално микроразмножаване на „Популация №5“ на *Rosa damascena*.

Генотип	Заложени експланти	Загинали експланти	Аксиларни прорастъци	Средно от буркан	Вкоренени рози	% на вкореняване
	Бр.	Бр.	Бр.	Бр.	Бр.	
повторение 1	40	0	314	62.8	311	99.0
повторение 2	40	0	301	60.2	294	97.7
повторение 3	40	0	313	62.6	313	100
Общо	120	0	928	61.8	918	98.9

4.7.3. Сравняване на броя на вкоренените растения, получени чрез двата изследвани метода.

Фиг. 10 Сравнителна характеристика



При сравняване на резултатите от размножаването на маслодайна роза „Популация №5“ чрез конвенционален и *in vitro* метод се установи, че методът на клоналното микроразмножаване е много по-бърз и ефективен (Фиг.10). При използване на метода на зелените резници едва около 37 % от всички заложени резници формират корен и се развиват до добре вкоренени млади растения, които могат да се използват като посадъчен материал. При прилагане на метода на клоналното микроразмножаване ефективността нараства на 765 % -от 120 заложени експланта са получени 918 бр. вкоренени растения т.е. този метод е около 21 пъти по-ефективен в сравнение с конвенционалния.

Методът на клонално размножаване при *in vitro* условия има редица предимства, като на първо място е фактът, че се постига мултипликация на изходните експланти. Това означава, че за да бъде получено определено количество посадъчен материал, ще бъде необходим много по-малко изходен растителен материал, по-малко ръчен труд и по-малка площ за размножаване в сравнение с конвенционалния метод. Освен това полученият посадъчен материал е биологично чист, изравнен, с нужните параметри и висок растителен потенциал. Този метод позволява да се работи целогодишно, независимо от климатичните условия. Всички тези предимства водят до съкращаване на цялата процедура по размножаване, което повишава ефективността и намалява себестойността на получените растения.

5. ИЗВОДИ

В резултат на проведените експерименти във връзка с клоналното микро-размножаване на маслодайна роза и култивирана шипка могат да бъдат направени следните по-важни изводи:

1. Видът на изходния експлант, който се въвежда в култура оказва съществено влияние върху пролиферацията. Най-висок потенциал за пролиферация 77.5 % (средно от трите изследвани видове рози) проявяват нодалните сегменти с дължина от 1.0 до 1.5 см. с една до две аксиларни пъпки.

2. Апикалните пъпки не са подходящи за въвеждане в култура, като едва 25 % от тях пролиферират. Изключение прави шипката генотип R1, при която този процент е сравнително по-висок – 40 %.

3. Използваните видове се различават по способността за пролиферация на нодалните сегменти. С най-висок пролифериращ потенциал 90 % средно от двата генотипа се отличава *Rosa damascene*.

4. Възрастта и жизненият статус на донорните растения оказват съществено влияние върху процеса на пролиферация. Всички изследвани генотипове проявяват много по-висок процент на индукция и пролиферация, когато за изходен експлант е използван млад прираст от заложици за вкореняване зелени резници в култивационно съоръжение (80-100%). Средната част на едногодишен прираст, при който растителната тъкан е подмладена, проявява сравнително добра способност за индукция и пролиферация, между 60-80% при маслодайна роза и 40 до 65% за шипката.

5. Най-подходящият момент за въвеждане на експлантите в култура при маслодайна роза е периодът на активна вегетация, докато за култивирана шипка подходящ момент е и началото на вегетация.

6. Като най-ефективна схема на обеззаразяване е определена комбинацията на два дезинфектанта $HgCl_2$ и $NaClO$. При този вариант на дезинфекция се получават максимален брой живи чисти експлантите - 76.25% при *Rosa damascene*, 82.5 % при бялата роза и 80% при шипката.

7. Генотипът, вариантите на хранителната среда за мултипликация и взаимодействие между тях оказват статистическо достоверно влияние върху варирането на мултипликацията на експлантите, изразена чрез общия брой на индуцираните адвентивни прорастъци и при трите изследвани видове рози. Варирането в общия брой на индуцираните адвентивни прорастъци се дължи в най-голяма степен на вариантите на хранителната среда, като на тях се пада 93.6 % от общото вариране при *Rosa damascene*, 68.0 % - при *Rosa alba* и 85.23 % - при култивирана шипка.

8. Най-голям процент реагирани експлантите с най-голям общ брой формиращи аксиларни прорастъци и най-голям брой аксиларни прорастъци върху един

експлант при всички изследвани видове се получават на среда MS основна с добавен само ВАР в концентрация от 0.5 до 3.0 mg/l. По-високата концентрация на ВАР води до намаляване на общият брой на прорастъците.

9. При комбиниране на ниска концентрация ВАР с други цитокинини – *kinetin*, *zeatin*, TDZ и CPPU, степента на мултипликация е по-ниска в сравнение със самостоятелното прилагане на ВАР. Комбинацията между ВАР и *kinetin* е по-добра от всички останали комбинации между цитокинини.

10. Прилаганите растежни регулатори в хранителната среда има достоверно и най-голямо влияние върху коренообразуването и при трите изследвани видове, като на тях се пада 49.7 % от общото вариране при *Rosa damascene*, 74.5 % от общото вариране при *Rosa alba* и 72.16 % от общото вариране при шипката. Генотипът оказва достоверно, но сравнително по-ниско влияние върху коренообразуването само при *Rosa damascene*, като на него се падат 30.75 % от общото вариране. Взаимодействието между двата изследвани фактора е статистически значимо само при бялата роза, но на него се пада едва 14.29 % от общото вариране.

11. Получените регенеранти и при трите вида рози се вкореняват отлично директно в торопочвена смес, без да е необходимо да преминават през среда за коренообразуване в *in vitro* условия. Процентът на успешно вкоренени млади растения е над 97.5 % .

12. При вкореняване при *in vitro* условия най-подходящо е добавянето към средата на ИВА в ниска концентрация (0.1mg/l). В този случай процентът на вкореняване варира от 95% при *Rosa damascena* до 82.5% при шипката.

13. Трите изследвани видове рози не се различават съществено по отношение на способността си за клонално микроразмножаване. *Rosa alba* показва малко по-добра способност за мултипликация, като при нея са получени най-голям общ брой аксиларни прорастъци - 44 броя, следвана от *Rosa damascena* с 39.06 броя и шипката с 38.93 броя.

14. При сравняване на резултатите от размножаването на подобрена местна популация на *Rosa damascena* („Популация №5“) чрез конвенционален и *in vitro* метод е установено, че методът на клоналното микроразмножаване е 21 пъти по-ефективен в сравнение с конвенционалния метод.

6. ПРИНОСИ

с научно - теоретичен характер

1. Направено е цялостно изследване на влиянието на различните видове експланти върху способността за индукция и пролиферация. Определени са най-подходящите комбинации от изследваните фактори върху обеззаразяването и пролиферацията на изходните експланти при три вида рози.

2. Проучено е влиянието на различни концентрации на ВАР като единствен цитокинин в средата за мултипликация и комбинирането му с други цитокинини върху мултипликацията при три вида рози. Установени са най-ефективните концентрации и комбинации от растежни регулатори, като резултатите са потвърдени в допълнителен експеримент.

3. Чрез статистически методи е установено влиянието на изследваните фактори – генотип, среда за мултипликация, среда за вкореняване и взаимодействието между тях върху варирането на мултипликацията и вкореняването.

4. Проучено е влиянието на различни условия *in vitro* и *ex vitro* и различни растежни регулатори върху процеса на вкореняване. Установена е високата ефективност на метода за директно вкореняване, без да се преминава през среда за вкореняване или да се ползва биореакторна система. Това е подход, различен от всички предлагани към момента при *in vitro* размножаване на проучваните видове.

5. За пръв път е сравнена ефективността на конвенционалните методи за размножаване на маслодайна роза „Популация №5“ с метода на клоналното микроразмножаване и е установена многократно по-високата ефективност на *in vitro* метода.

6. За пръв път са проведени комплексни изследвания във връзка с клоналното размножаване на бяла маслодайна роза и двата български сорта култивирана шипка.

с научно - приложен характер

1. Разработен е цялостен протокол за клонално микроразмножаване на Казанлъшка маслодайна роза (*Rosa damascena* Mill. f. *Trigintipetala* Dieck).

2. Разработен е цялостен протокол за клонално микроразмножаване на бяла маслодайна роза.

3. Разработен е цялостен протокол за клонално микроразмножаване на култивирана шипка.

4. Представена е възможност за облекчаване процеса по *in vitro* култивиране, като е спестен един цял етап (*in vitro* вкореняване), което води до значителни икономии при производството на посадъчен материал.

5. През 2017 г. са създадени първите в България производствени насаждения от *in vitro* размножен посадъчен материал на маслодайна роза. Растителният материал е произведен по разработените в тази дисертация протоколи за клонално микроразмножаване.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Веселина Баджелова**, Виолета Божанова “Проучване върху клоналното *in vitro* размножаване на култивирана шипка сорт “Пловдив 1” и сорт “Вебещина 115”, “научни трудове”, Vol.3, Карнобат, 2016

2. **Veselina Badzhelova** “*In vitro* propagation of oil-bearing rose (*Rosa damascena Mill.*)”, „Agricultural Science and Technology“, Vol.9, № 3, pp 194-197, St. Zagora, 2017

3. **Veselina Badzhelova**, V. Bozhanova, G. Chokov “*In vitro* propagation of oil-bearing rose (*Rosa alba.*)”, „Agricultural Science and Technology“, Vol.10, №2, pp 90-95, St. Zagora, 2018

4. **Veselina Badzhelova**, Violeta Bozhanova “Efficient protocol for *in vitro* clonal propagation of *Rosa damascena Mill.* and its comparison with conventional propagation method”, Bulgarian Journal of Crop Science, Rastenievadni nauki, 55(6), 37-44, 2018

Summary

The oil-bearing rose has been the most symbolic industrial crop of Bulgaria. First in the world is the renowned Kazanlak oil-bearing rose (*Rosa damascena Mill.f. triginipetala Dieck*). It has been cultivated for the production of rose oil, rose concrete and rose absolute which are widely used in cosmetics, pharmaceuticals and the food industry. In recent years, the attention of scientists and farmers has focused on the second most important oil-bearing rose (*Rosa alba*). Presently, oil-bearing rose planting material is mainly obtained from the rooting of sprout cuttings in a cultivation facility, a technology developed by the Institute of Roses, Essential and Medical Cultures in Kazanlak in 1986. This method is outdated, slow and inefficient. In this regard, the aim of this dissertation is to investigate key factors influencing plant multiplication in *in vitro* conditions and to develop protocols for clonal micropropagation of oil-bearing rose and cultivated rosehip. This technology should provide more effective system for producing plant material in industrial conditions, keeping the quality of plants, finishing the process in shorter production time and using less space for initial growing. A comprehensive study has been made on the impact of different types of explants, the age and life status of the donor plants from which they are released, and the moment of their introduction into culture on the ability to induce and proliferate. The appropriate combinations of the investigated factors were identified for the decontamination and proliferation of the basal explants in three types of roses. It was found that 1.0 to 1.5 cm long nodal segments from specially cultivated mother plants are the most suitable explants for cultivation. These explants were subjected to combined method of sterilization with 0.2% solution of HgCl₂ for 3 minutes followed by 0.5% solution of NaClO for 20 minutes and 0.25% solution of NaClO for 30 minutes. The best results of multiplication were obtained in basic MS medium with added BAP quantity of 0.5 to 3.0 mg/L. At combination of low BAP concentration with other cytokines - kinetin, zeatin, TDZ and CPPU the degree of multiplication is lower than that of BAP alone.

The influence of different conditions *in vitro* and *ex vitro* and different growth regulators on the rooting process has been studied. The high efficiency of the direct rooting method has been established without passing through a rooting medium or using a bioreactor system. The percentage of successfully rooted young plants is over 97, 5%. By statistical methods the influence of the factors studied - genotype, multiplication medium, rooting medium and the interaction between them on the variation of the multiplication and rooting was established. Comparing the reproduction results of an improved local population of *Rosa damascena* ("Population No. 5") by conventional and *in vitro* methods, clonal micropropagation was found to be 21 times more effective than the conventional method. In 2017 the first in Bulgaria production plantation with *in vitro* propagated propagation material of oil-bearing rose were created. The plant material is produced according to the protocols for clonal micropropagation developed in this dissertation.