

<https://doi.org/10.15407/frg2022.04.340>

УДК 57.084.1

ЕФЕКТ ДОДАВАННЯ РІДКОГО ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ЧЕРЕШНІ СОРТУ GISELA 5 В УМОВАХ IN VITRO

С.О. БАЗЮК, М.С. КОБИЛЕЦЬКА

Львівський національний університет імені Івана Франка

79005 Львів, вул. Грушевського, 4

e-mail: stasbazyuk@gmail.com

Метою роботи було розробити ефективний спосіб культивування in vitro черешні сорту Gisela 5 (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*), яка є цінним сортом підщепи в кліматичних умовах України, використовуючи методику з додаванням рідкого поживного середовища на етапі видовження з подальшим укоріненням. Вивчали вплив додавання рідкого поживного середовища (Quorin & Leroivre — QL) з гібереловою кислотою (ГК₃) у трьох концентраціях (0,5 мг/л, 1,0 мг/л та 1,5 мг/л) на третьому тижні культивування на середовищі для розмноження з подальшим культивуванням протягом двох тижнів. Також було досліджено вплив попереднього додавання рідкого поживного середовища на ефективність подальшого вкорінення. Після завершення культивування проводили заміри ростових показників рослин. Показано, що додавання 5 мл рідкого поживного середовища з 1 мг/л ГК₃ виявилось найефективнішим, з високою кількістю отриманих пагонів для вкорінення. У варіанті з ГК₃ 1,5 мг/л спостерігали збільшення кількості пагонів з некротичними проявами та з ознаками гіпергідратації (вітрифікації), такі пагони непридатні для подальшого вкорінення або клонального розмноження. Вважається, що це було спричинене збільшенням рівня вологості в ємності з експлантатами та концентрації ГК₃. Встановлено залежність укорінення від попереднього додавання рідкого поживного середовища з ГК₃, внаслідок якого збільшується загальна кількість коренів, їхня довжина і загальна кількість укорінених експлантатів порівняно з контрольним варіантом. Це, насамперед, покращить подальшу адаптацію рослин до умов ex vitro, проте чіткої залежності від концентрації ГК₃ не виявлено.

Ключові слова: підщепа черешні Gisela 5, in vitro, рідке поживне середовище, видовження пагонів, клональне розмноження, вкорінення, регулятори росту рослин, гіберелова кислота.

Сучасне ведення сільського господарства потребує вирощування якісного, безвірусного рослинного матеріалу, який можна отримати культивуванням рослин in vitro. Такий метод дає змогу вирощувати велику кількість рослин, інтенсивно їх розмножувати, зберігати сортові особливості та одержувати якісний рослинний матеріал [1].

Цитування: Базюк С.О., Кобилецька М.С. Ефект додавання рідкого поживного середовища при культивуванні черешні сорту Gisela 5 в умовах in vitro. *Фізіологія рослин і генетика*. 2022. 54, № 4. С. 340—350. <https://doi.org/10.15407/frg2022.04.340>

Карликові й напівкарликові підщепи сприяють підвищенню ефективності та якості плодів порівняно зі стандартними підщепами. Карликова підщепа черешні Gisela 5 була отримана від схрещування *Prunus cerasus* × *Prunus canescens* в Гіссенському університеті імені Юстуса Лібіха [2]. Відомо, що Gisela 5 сповільнювала ріст у висоту до 50 % або й більше щодо сорту Mazzard [3]. Крім того, ця підщепа пришвидшувала цвітіння та плодоношення [4–7].

На ефективність культивування рослин *in vitro* впливає багато чинників: склад поживного середовища, якість води, джерела карбону, регулятори росту, вітаміни тощо. Дуже важливими є умови культивування: температура, вологість, освітлення і фотоперіод, дотримання чистоти й стерильності приміщення, правильне поводження з рослинами при підготовці їх до висаджування, контроль мікробного забруднення, вітрифікації, некрозу пагонів тощо [1].

Метою даної роботи було розробити ефективний спосіб і методику культивування черешні сорту Gisela 5 в умовах *in vitro* з урахуванням комерційних потреб та здешевлення процесу виробництва без погіршення якості рослинного матеріалу. Для підвищення ефективності культивування Gisela 5 було досліджено вплив додавання рідкого поживного середовища, яке містило регулятор росту ГК₃ у різних концентраціях, на проліферацію пагонів і подальшу успішність їхнього вкорінення.

Методика

1. Рослинний матеріал. Стерильний рослинний матеріал черешні Gisela 5 (Gi1482) *in vitro* був отриманий від CDB (Об'єднання розсадників Німеччини, www.cdb-rootstocks.com) у відповідності до ліцензії, виданої для ТзОВ Долина Агро від 6.12.2019.

2. Склад і приготування поживного середовища. Для приготування середовища використовували очищену за допомогою зворотного осмосу воду. Мікроелементи, макроелементи та вітаміни додавали згідно з протоколами, які наведені в табл. 1. Усі інгредієнти середовища були придбані у Duchefa Biochemie B.V. Базові розчини зберігали у темряві за 4–7 °С до двох місяців або відповідно до рекомендацій виробника. Середовища стерилізували в автоклаві ВК-75 за 121 °С упродовж 20 хв. Готове до використання середовище зберігали за температури 20±2 °С не довше двох тижнів після приготування.

2.1. Поживне середовище для клонального розмноження. Для клонального розмноження використовували макроелементи QL [8] і модифіковані мікроелементи QL [1] з 100 мг/л FeEDDHA, вітаміни за Walkey [9] (див. табл. 1), також 6-бензиламінопурин (БАП) — 0,5 мг/л, метатополін (МТ) — 0,5 мг/л, індоліл-3-масляну кислоту (ІМК) — 0,1 мг/л, агар — 5,0 г/л, сахарозу — 3 %, рН 5,5.

2.2. Поживне середовище для видовження. Поживне середовище для видовження містило розведені удвічі макроелементи QL і модифіковані мікроелементи QL з 100 мг/л FeEDDHA, вітаміни за Walkey (див. табл. 1), ГК₃ — 1 мг/л, ІМК — 0,1 мг/л, агар — 5,0 г/л, сахарозу — 3 %, рН 5,5. Рідке середовище використовували аналогічного складу, окрім ГК₃, яку застосовували у трьох варіантах: 0,5, 1,0 і 1,5 мг/л.

ТАБЛИЦЯ 1. Склад базових середовищ

Макроелементи, г/л	MS	Quorin Lepoivre (QL)
NH ₄ NO ₃	1,65	0,4
KNO ₃	1,9	1,8
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,44	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,37	0,36
KH ₂ PO ₄	0,17	0,27
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	—	1,2
Мікроелементи, мг/л	Модифіковане QL	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	
H ₃ BO ₃	12	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	
KI	0,08	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	
Вітаміни, мг/л	Walkey	Модифіковане Walkey
Мезоінозит	100	100
Тіамін HCl	0,4	0,1
Нікотинова кислота	—	0,5
Піридоксин	—	0,25

2.3. Поживне середовище для вкорінення. Поживне середовище для вкорінення містило макроелементи MS [8] і модифіковані мікроелементи QL з 100 мг/л FeEDDHA, модифіковані вітаміни за Walkey (табл. 1), ГК₃ — 0,1 мг/л та ІМК — 1 мг/л, 3 % сахарози, 5,0 г/л агару, pH 5,6.

3. Процес культивування in vitro. **3.1. Клональне розмноження.** На початковому етапі досліджень перевіряли санітарний стан культури на наявність грибного/дріжджового або бактеріального забруднення. Пагони переміщували на стерильний пергаментний аркуш, використовуючи один набір інструментів на експлантат. Калюс, деформовані або пошкоджені тканини, пагони з ознаками некрозу, вітрифікації видаляли. Пагони, виокремлені з розеток, зачищали від нижніх листків, залишаючи 2—3 листки на верхівці пагона. Пагони завдовжки 1—1,5 см вставляли в агаризовані середовища для клонального розмноження половиною верхньої частини назовні.

3.2. Процес видовження. Видовження є важливою умовою

культивування для подальшого вкорінення. Аналогічно, як і на етапі клонального розмноження, рослини попередньо перевіряли на мікробне забруднення, переміщували на стерильний пергаментний папір та використовували один набір інструментів на рослину.

Етап видовження проводили двома методами:

1) розетки або пагони розміром 0,5—1 см (див. рис. 1, 2) висаджували в агаризоване середовище для видовження;

2) після першого етапу на третьому тижні культивування на середовищі для клонального розмноження в ємність для культивування під ламінарною шафою додавали 5 мл рідкого середовища для елонгації з ГК₃ у трьох варіантах: 0,5, 1,0 та 1,5 мг/л. Перед додаванням ємності дезінфікували етиловим спиртом (95 %), а середовище вносили стерильною скляною піпеткою.

3.3. Процес вкорінення. Ефективність вкорінення залежить від успішності попередніх етапів, умов культивування, правильної методики висадження експлантатів [1]. Пагони, завдовжки 1,5—2,5 см, відділяли від розетки, відрізали калюс та зачищали від змертвілих або вітрифікованих листків. Подібно до процесу клонального розмно-

ження, нижні листки також відрізали, залишаючи на верхівці 2—3 листки. Готові до висадки пагони переміщали в агаризоване середовище (див. рис. 1, 2).

3.4. Культивування рослин. Культивування експлантатів здійснювали за такою схемою. Пагони поділили на дві групи. Першу групу висадили на середовище для клонального розмноження і культивували протягом трьох тижнів, на третьому тижні вносили рідке середовище у трьох варіантах з GK_3 у концентрації 0,5, 1,0 та 1,5 мг/л, і культивували додатково два тижні.

Другу групу висадили на середовище для видовження і культивували упродовж п'яти тижнів. Після завершення культивування проводили заміри ростових параметрів і висаджували пагони на середовище для вкорінення з подальшим культивуванням упродовж чотирьох тижнів. Схему культивування наведено на рис. 3. Важливо відзначити, що цей процес може бути циклічним при комерційному вирощуванні, оскільки на етапах видовження і клонального розмноження розміри пагонів часто варіюють за довжиною.

Культивували в спеціальних приміщеннях з підтриманням заданої температури, вологості і циркуляції повітря, обладнаних стелажми з освітленням. Двічі на тиждень проводили дезінфекцію приміщення шляхом озонування, вологого прибирання та дезінфекції (етанол 95 %) стелажів.

Експлантати культивували упродовж чотирьох тижнів. У варіанті з додаванням на третьому тижні рідкого поживного середовища культивували додатково два тижні за температури 22 ± 1 °C, фотоперіоду 16 год. Для освітлення (3000 лк) використовували світлодіодні лампи холодного білого світла.

Результати та обговорення

Етап видовження і додавання рідкого поживного середовища. Етап видовження важливий для подальшого успішного вкорінення. За дослідження впливу додавання рідкого поживного середовища, як визначальний показник використовували кількість пагонів на експлантатах на цьому етапі.

На підставі отриманих результатів, наведених у табл. 2 і рис. 4, можна зробити висновок, що додавання рідкого поживного середовища у всіх варіантах збільшувало довжину пагонів та їхню кількість. У варіанті з GK_3 1,0 мг/л було отримано найбільшу кількість пагонів, придатних для вкорінення. Проте у всіх досліджуваних варіантах також підвищувалась кількість пагонів з проявами некрозу на верхівках і вітрифікованих листків. Пагони з некротичними проявами і вітрифікацією непридатні для подальшого вкорінення, також такі пагони не використовують для подальшого клонального розмноження. Причиною таких змін могла бути надто висока концентрація регулятора росту. Зокрема у варіанті з найвищою досліджуваною концентрацією GK_3 1,5 мг/л виявлено найбільшу кількість таких пагонів.

Важливо також відзначити, що в кожному з варіантів були пагони, придатні для клонального розмноження, вкорінення та видовження, що дало змогу підтримувати циклічний процес культивування, висаджуючи

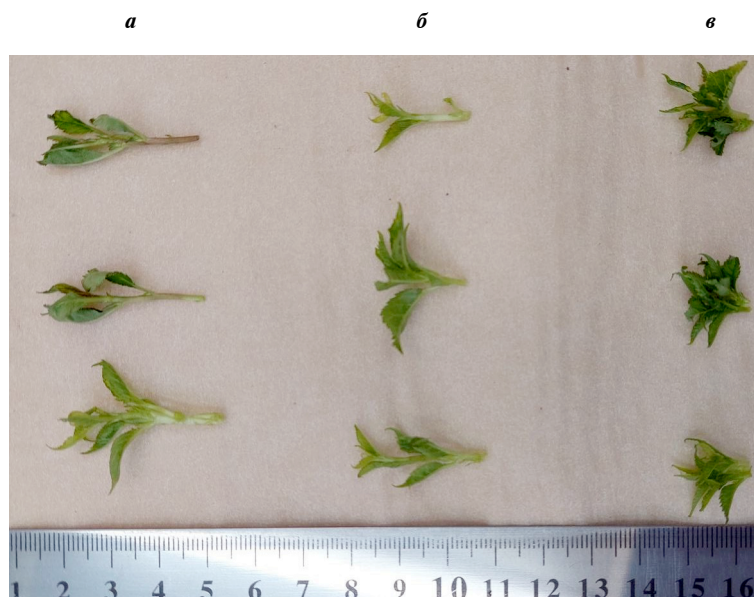


Рис. 1. Рослини які висаджували в поживне середовище:

a — пагони/розетки для видовження; *б* — пагони для клонального розмноження; *в* — пагони для укорінення

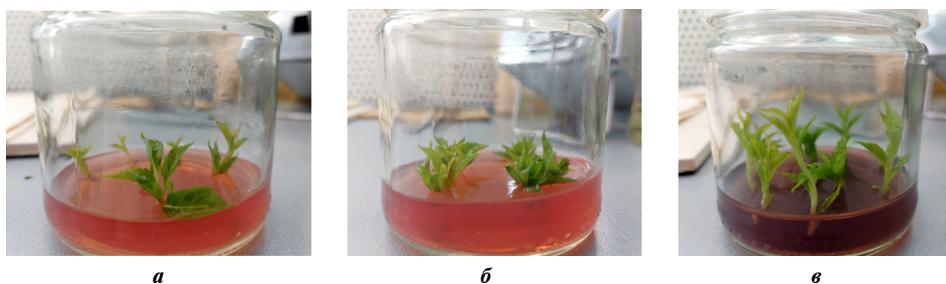


Рис. 2. Зовнішній вигляд рослин після висадження в поживне середовище:

a — клональне розмноження, *б* — видовження, *в* — вкорінення



Рис. 3. Схема культивування рослин черешні сорту Gisela 5

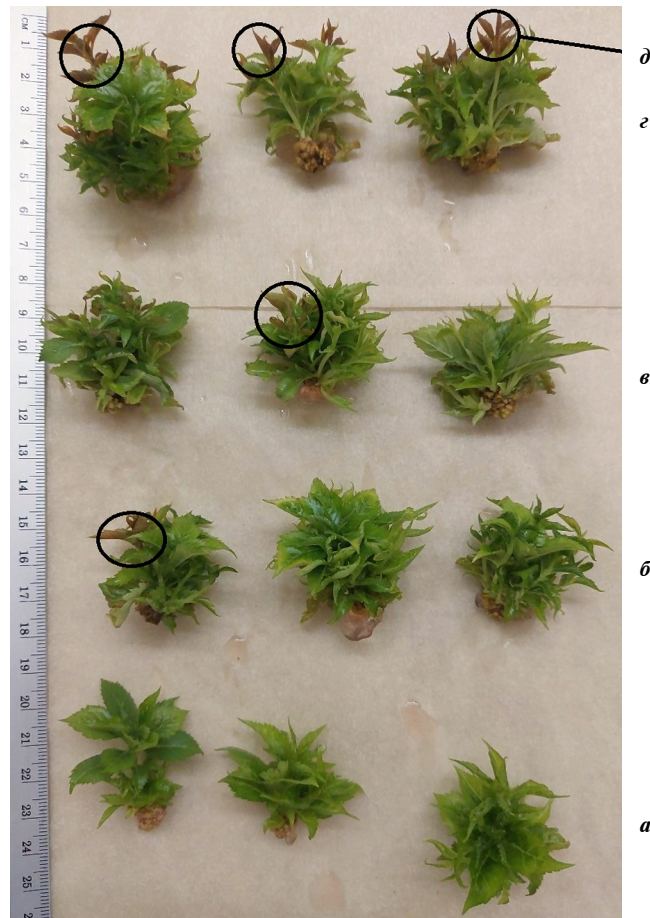


Рис. 4. Зовнішній вигляд рослин на 5-му тижні культивування на етапі видовження: а — контроль; б — ГК₃ 0,5 мг/л; в — ГК₃ 1,0 мг/л; г — ГК₃ 1,5 мг/л; д — пагони з ознаками некрозу

ТАБЛИЦЯ 2. Ростові характеристики рослин черешні *Gisela 5* на етапі елонгації (5-й тиждень) ($n = 100$, $\bar{x} \pm SE$)

Показник	Контроль	ГК ₃ , мг/л		
		0,5	1,0	1,5
Довжина пагона, см	2,41±0,04	3,15±0,07	3,70±0,06	3,91±0,06
Загальна кількість пагонів, шт.	3,68±0,11	4,51±0,12	5,33±0,13	5,02±0,11*
Кількість пагонів для клонального розмноження, шт.	1,55±0,06	1,76±0,08	1,75±0,06*	2,04±0,08
Кількість пагонів для видовження, шт.	0,53±0,06	0,88±0,05*	0,54±0,05	0,53±0,05
Кількість пагонів для вкорінення, шт.	1,59±0,07	1,88±0,097	3,04±0,09*	2,44±0,05
% пагонів з некрозом	2	4	7	15
% пагонів з ознаками вітрифікації	1	5	6	12

*Різниця істотна порівняно з контролем за $p \leq 0,5$.

експлантати на середовища для клонального розмноження, видовження і вкорінення одночасно згідно зі схемою, наведеною на рис. 3.

Некроз пагонів часто виникає внаслідок відсутності або недостатньої кількості регуляторів росту групи цитокінінів [10, 11]. Проте некротичні ураження, викликані нестачею цитокінінів, в нашому випадку малоймовірні, бо середовище для клонального розмноження, в яке згодом додавали рідке середовище з ГК₃, містило БАП і МТ — цитокінінові регулятори росту. Відомо, що збільшення вологості в культуральній ємності підвищує ризик розвитку некрозу і вітрифікації пагонів [1]. Очевидно, що саме це спричинило збільшення кількості пагонів з такими ознаками в усіх варіантах з додаванням рідкого поживного середовища. Зниження появи ознак вітрифікації і некрозу можна досягнути завдяки зменшенню часу культивування, використанню меншої кількості рідкого середовища, зміні умов культивування, зокрема температури, вологості повітря та освітлення, а також мінерального складу поживного середовища [12, 13]. Проте чітке визначення чинників виникнення некрозів і відповідного коригування умов культивування для рослин черешні Gisela 5 потребує додаткових досліджень.

Етап вкорінення. Наступним етапом наших досліджень було визначення впливу попередніх етапів культивування на ефективність вкорінення. Для цього пагони з етапу видовження і додавання рідкого поживного середовища, а також пагони з етапу клонального розмноження висаджували в середовище для вкорінення. Через чотири тижні культивування проаналізували морфологічні показники експлантатів. Пагони, які не вкорінились або довжина кореня яких була меншою за 0,5 см, у вимірюваннях не використовували. У табл. 3 та на рис. 5 наведено дані, отримані після культивування пагонів черешні сорту Gisela 5 на середовищі для вкорінення.

Одним із завдань дослідження було показати важливість етапу видовження для успішного вкорінення в умовах *in vitro*. Тому при висаджуванні рослин на середовище для вкорінення також були взяті пагони з етапу клонального розмноження, які були придатними до висаджування, завдовжки 1,5 см. Отримані результати свідчать, що такі рослини вкорінювались найгірше, в них були найменші кількість коренів, довжина кореня, довжина пагона практично не збільшувалась з часу висадження, частка вкорінених рослин також виявилась

ТАБЛИЦЯ 3. Ростові характеристики рослин черешні Gisela 5 на етапі вкорінення (4 тижні) ($n = 100$, $x \pm SE$)

Варіант	Довжина пагона, см	Довжина кореня, см	Кількість коренів, шт.	% укорінених рослин
Контроль (клональне розмноження)	2,01±0,03	2,25±0,04	2,13±0,10	47
Контроль (видовження)	2,41±0,04	2,79±0,06	3,53±0,12	64
ГК ₃ 0,5 мг/л	2,59±0,04	3,04±0,06*	3,72±0,17*	73
ГК ₃ 1,0 мг/л	2,54±0,03	3,54±0,05*	4,96±0,16	70
ГК ₃ 1,5 мг/л	2,58±0,03	3,52±0,04	4,70±0,14*	72

*Різниця істотна порівняно з контролем за $p \leq 0,5$.



Рис. 5. Зовнішній вигляд рослин на 4-му тижні культивування з етапу вкорінення: *a* — контроль (клональне розмноження); *б* — контроль (видовження); *в* — ГК_3 0,5 мг/л; *г* — ГК_3 1,0; *д* — ГК_3 1,5 мг/л

найнижчою. Рослини, які пройшли етап елонгації, мали загалом значно кращі ростові показники, ніж рослини з клонального розмноження. Проте рослини, у середовище для культивування яких було додано рідке поживне середовище, мали вищі показники, ніж ті, які попередньо вирощували на середовищі для видовження.

Також у варіантах з попереднім додаванням ГК_3 були вищі показники довжини пагона. У нашому випадку зв'язок між попереднім додаванням ГК_3 і вкоріненням може включати такі фактори, як ГК_3 -індукований синтез індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) або полярний транспорт ІОК. Наприклад, у двотижневого карликового горошку обприскування ГК_3 підвищило рівень ендогенної ІОК у 8 разів [14].

Ризогенез у пагонах деревних порід, вирощених *in vitro*, часто є доволі проблематичним, що призводить до значних економічних витрат на цій стадії [15]. Розвиток бічних коренів є важливим кроком

для регенерації деревних порід *in vitro* і обов'язковим для більшості генотипів за адаптації до умов *ex vitro* [16]. Індоліл-3-масляна кислота — незамінний ауксин, який використовується для індукції коренів *in vitro*, оскільки він толерантніший до фотодеградації та інактивації ІОК-оксидазою [17]. Проте на даний час вплив ГК₃ на ефективність вкорінення *in vitro* досліджений недостатньо. Відомо, що обробка пагонів *Salvia miltiorrhiza* розчином ГК₃ прискорювала проліферацію бічних коренів [18]. Однак для встановлення тривалого впливу обробки ГК₃ та впливу попередньої обробки на ростові процеси експлантів через один або декілька пасажів культивування *in vitro* потрібні додаткові дослідження.

Таким чином, на підставі результатів проведених досліджень можна стверджувати, що додавання рідкого поживного середовища з ГК₃ підвищує ростові показники експлантів порівняно зі звичайним культивуванням лише на агаризованому середовищі. Такий метод дає змогу за меншу кількість часу культивувати більшу кількість експлантів, пропускаючи етап елонгації на агаризованому середовищі, що скорочує культивування з 10 тижнів до 5 на етапах клонального розмноження і видовження (див. рис. 3). Важливою складовою культивування є контроль ознак некрозу і вітрифікації. Результати наших досліджень показали, що у варіанті з додаванням рідкого поживного середовища з ГК₃ 1,5 мг/л ці показники були найвищими, тобто значна частина рослин була непридатною для подальшої роботи. Встановлено також пролонгований ефект додавання рідкого поживного середовища під час етапу видовження на агаризованому середовищі на ефективність укорінення. Пагони, які культивували з додаванням ГК₃ на попередніх етапах, мали кращі ростові характеристики ніж рослини, які були взяті з етапу клонального розмноження.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Druart P. Micropropagation of prunus species relevant to cherry fruit production. Protocols for micropropagation of selected economically important horticultural plants. *Methods Mol. Biol.* 2013. **994**. P. 119—136. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_9
2. Long L.E., Kaiser C. Sweet cherry rootstocks for the Pacific Northwest. A Pacific Northwest Extension Publication, PNW 619, Oregon State University. 2010.
3. Long L.E. Cherry training systems, selection and development. PNW 543, Corvallis, Oregon State University. 2003.
4. Erwin D.C., Ribeiro O.K. Phytophthora diseases worldwide. APS Press, American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 1996. P. 562.
5. Spahić A., Spahić A., Begić-Akagić A. Testing of 'Gisela 5' and 'Santa Lucia 64' cherry rootstocks in Bosnia and Herzegovina. *Acta Agricult. Slovenica*. 2012. **99**, N 2. P. 129—136. <https://doi.org/10.2478/v10014-012-0012-5>
6. Šiško M. In vitro propagation of 'Gisela 5' (*Prunus cerasus* × *P. canescens*). *Agricultura*. 2011. **8**, N 1. P. 31—34.
7. Zimmermann A. 'Gisela 5', a dwarfing rootstock for sweet cherries from Giessen in a trial. *Obstbau*. 1994. **19**. P. 62—63.
8. Quorin, M., Lepoivre, P. Étude de milieux adaptés aux culture de prunus. *Acta Hort.* 1977. **78**. P. 437—442.
9. Walkey D. Production of apple plantlets from axillary bud meristems. *Can. J. Plant Sci.* 1972. **52**. P. 1085—1087.

10. Kataeva N. Peculiarities of micropropagation of apple varieties with declined rooting ability. *Agric. Biol.* 1986. **4**. P. 18–23.
11. Wang Po-Jen, Hu Ching yeh. In vitro cloning of the deciduous timber tree *Sassafras randaiense*. *Z. Pflanzenphysiol.* 1984. **113**. P. 331–335.
12. Martin K.P., Zang C.L., Slater A., Madassery, J. Control of shoot necrosis and plant death during micropropagation of banana and plantains (*Musa* spp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2007. **88**. P. 51–59.
13. Nezami S.R., Yadollahi A., Hokmabadi H., Eftekhari M. Control of shoot tip necrosis and plant death during in vitro multiplication of Pistachio rootstock UCB1 (*Pistacia intergrima* × *P. atlantica*). *J. Nuts*. 2015. **6**. P. 27–35.
14. Law D.M., Hamilton R.H. Effects of gibberellic acid on endogenous indole-3-acetic acid and indoleacetyl aspartic acid levels in dwarf pea. *Plant Physiol.* 1984. **75**. P. 255–256.
15. Wiszniewska A. Rooting response of *Prunus domestica* L. microshoots in the presence of phytoactive medium supplements. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2016. **125**. P. 163–176. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0937-6>
16. Geiss G., Gutierrez L., Bellini C. Adventitious root formation: new insights and perspectives. In: Roberts J.A. (Ed.). *Annual plant reviews online*. 2018. P. 127–156. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0400>
17. Elmongy M.S., Cao Y., Zhou H., Xia Y. Root development enhanced by using indole-3-butyric acid and naphthalene acetic acid and associated biochemical changes of in vitro azalea microshoots. *J. Plant Growth Regul.* 2018. **37**. P. 813–825. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9776-5>
18. Ali M., Abbasi B.H., Ali G.S. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2015. **120**. P. 1099–1106.

Отримано 18.05.2022

REFERENCES

1. Druart, P. (2013). Micropropagation of prunus species relevant to cherry fruit production. Protocols for micropropagation of selected economically important horticultural plants. *Methods Mol. Biol.*, 994, pp. 119–136. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_9
2. Long, L.E. & Kaiser, C. (2010). Sweet cherry rootstocks for the Pacific Northwest. A Pacific Northwest Extension Publication, PNW 619, Oregon State University.
3. Long, L.E. (2003). Cherry training systems, selection and development, PNW 543, Corvallis, Oregon State University.
4. Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K. (1996). Phytophthora diseases worldwide. APS Press, American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
5. Spahić, A., Spahić, A. & Begić-Akagić, A. (2012). Testing of ‘Gisela 5’ and ‘Santa Lucia 64’ cherry rootstocks in Bosnia and Herzegovina. *Acta Agriculturae Slovenica*, 99, No. 2, pp. 129–136. <https://doi.org/10.2478/v10014-012-0012-5>.
6. Šiško, M. (2011). In vitro propagation of ‘Gisela 5’ (*Prunus cerasus* × *P. canescens*). *Agricultura*, 8, No. 1, pp. 31–34.
7. Zimmermann, A. (1994). ‘Gisela 5’, a dwarfing rootstock for sweet cherries from Giessen in a trial. *Obstbau (Germany)*, 19, pp. 62–63.
8. Quorin, M., & Lepoivre, P. (1977). Étude de milieux adaptés aux culture de prunus. *Acta Hort.*, 78, pp. 437–442.
9. Walkey, D. (1972). Production of apple plantlets from axillary bud meristems. *Can. J. Plant Sci.*, 52, pp. 1085–1087.
10. Kataeva, N. (1986). Peculiarities of micropropagation of apple varieties with declined rooting ability. *Agric. Biol.*, 4, pp. 18–23.
11. Wang, Po-Jen & Hu, Ching yeh (1984). In vitro cloning of the deciduous timber tree *Sassafras randaiense*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 113, pp. 331–335.
12. Martin, K.P., Zang, C.L., Slater, A. & Madassery, J. (2007). Control of shoot necrosis and plant death during micropropagation of banana and plantains (*Musa* spp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 88, pp. 51–59.

13. Nezami, S.R., Yadollahi, A., Hokmabadi, H., & Eftekhari, M. (2015). Control of shoot tip necrosis and plant death during in vitro multiplication of Pistachio rootstock UCB1 (*Pistacia integrima* x *P. atlantica*). *J. Nuts*, 6, pp. 27-35.
14. Law, D.M. & Hamilton, R.H. (1984). Effects of gibberellic acid on endogenous indole-3-acetic acid and indoleacetyl aspartic acid levels in dwarf pea. *Plant Physiol.*, 75, pp. 255-256.
15. Wiszniewska, A. (2016). Rooting response of *Prunus domestica* L. microshoots in the presence of phytoactive medium supplements. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 125, pp. 163-176. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0937-6>
16. Geiss, G., Gutierrez, L. & Bellini, C. (2018). Adventitious root formation: new insights and perspectives. In: Roberts JA (Ed). *Annual plant reviews online*, pp 127-156. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0400>
17. Elmongy, M.S., Cao, Y., Zhou, H. & Xia, Y. (2018). Root development enhanced by using indole-3-butyric acid and naphthalene acetic acid and associated biochemical changes of in vitro azalea microshoots. *J. Plant Growth Regul.*, 37, pp. 813-825. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9776-5>
18. Ali, M., Abbasi, B.H. & Ali, G.S. (2015). Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120, pp. 1099-1106.

Received 18.05.2022

EFFECT OF ADDING LIQUID NUTRIENT MEDIUM AT CULTIVATION OF PRUNUS CULTIVAR GISELLA 5 UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

S.O. Bazyuk, M.S. Kobyletska

Ivan Franko Lviv National University
4 Hrushevskoho St., Lviv, 79005, Ukraine
e-mail: stasbazyuk@gmail.com

The aim of the study was to develop an effective method of *in vitro* cultivation of cherry cultivar Gisela 5 (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*), which is a valuable rootstock variety in the climatic conditions of Ukraine, using the method of adding liquid nutrient medium at the stage of elongation and further rooting stage. The effect of adding liquid nutrient medium (Quorin & Lepoivre — QL) with gibberellic acid (GA₃) at three concentrations (0.5 mg/l, 1.0 mg/l and 1.5 mg/l) when added on the third week of cultivation on the medium for multiplication was studied with subsequent cultivation for two weeks. Also, the effect of pre-addition of liquid nutrient medium on the effectiveness of subsequent rooting was investigated. It was shown that the addition of 5 ml of liquid nutrient medium with 1 mg/l GA₃ was the most effective, with a high number of plants obtained for rooting. In the case of GA₃ 1.5 mg/l the number of shoots with necrotic manifestations and signs of hyperhydration (vitrification) increased, such shoots are unsuitable for further rooting or multiplication. It was supposed that the reason for this was the increase in humidity in the container with plants, and the high concentration of GA₃. The dependence of rooting on the previous addition of liquid nutrient medium with GA₃ was evaluated, with an increase in total roots, root length and total number of rooted plants compared to the control, which in turn will improve further adaptation of plants to *ex vitro* conditions, but a clear dependence on concentration GA₃ was not observed.

Key words: Gisela 5 cherry rootstock, *in vitro*, liquid nutrient media, elongation, multiplication, rooting, plant growth regulators, gibberellic acid.