

MAASIKA TERVENDATUD ISTUTUSMATERJALI PRODUKTIIVSUS SÕLTUVALT SÖÖTMEST JA MERIKLOONI VANUSEST

V. Vasar, K. Kotkas

SUMMARY. *Productivity of disease-free strawberry plants influenced by culture medium and mericlone. The productivity of strawberry plants depends highly on the quality of initial planting material. The aim of current project was to study the growth and development of microshoots in vitro and the formation and quality of daughter plants depending on the composition of culture medium, age of mericlone and genotype-specific growth habits. Microshoots of three cultivars – ‘Jonsok’, ‘Bounty’, ‘Senga Sengana’ – were introduced into tissue culture in 4 different years and preserved in vitro in EAU Plant Biotechnological Research Centre EVIKA gene-bank. Microshoots were cultivated either on MS (high salt concentration) or on Mullin’s medium (lacks ammonium nitrate and low salt concentration). On in vitro level the proliferation rate of microshoots was counted; in field conditions the number of runners, daughter plants and pre-plants was counted during the autumn season after planting.*

MS medium caused active proliferation, but the shoots remained too short for rooting and the level of vitrification was high. On Mullin’s medium the proliferation rate was lower, but shoots elongated enough for successful rooting. In field tests the subsequent influence of culture medium composition was slightly evidenced. Plants propagated on Mullin’s medium produced more daughter plants than the ones grown on MS-medium. The age of mericlone did not have significant effect on the production of runners or daughter plants. The formation of daughter plants depended more on cultivars properties than on the duration of in vitro cultivation. The highest number of runners was formed on cv ‘Jonsok’. The development of runners on cvs ‘Bounty’ and ‘Senga Sengana’ was slower and therefore the production of daughter plants remained lower than on cv ‘Jonsok’.

Keywords: in vitro, *Fragaria* × *ananassa*, runner, daughter plant, MS, Mullin, mericlone.

Maasikataimede saagikus sõltub eelkõige istutusmaterjali kvaliteedist, samuti sordi eripärast ja kasvatustehnoloogias. Kõrge saagipotentsiaaliga tervendatud istutusmaterjali paljundamiseks on kogu maailmas kasutusel meristeemmeetod, mis seisneb pungameristeemi kultiveerimises ja sellest regenereerunud taimede paljundamises *in vitro*.

On leitud, et mõnede maasikasortide mikropaljundatud taimedel areneb tavapaljundatutega võrreldes rohkem tütaraimi (Boxus, Larvor, 1987). *In vitro* kasvatatud taimmaterjali kvaliteeti ning edasist käitumist põllul arvatakse mõjutavat koekultuuri käigus kasutatud toitesegu koostis (Donnelly *et al.*, 1980; Pennell, 1987), kasvuregulaatorite, enamasti bensüüladeniini (BA) hulk söötmes (Navatel, 1983; Marcotrigiano *et al.*, 1984; Rancillac *et al.*, 1987) ning ülekannete arv paljundusperioodi vältel *in vitro* (Rancillac *et al.*, 1987). Siiski ei ole teadlaste seisukohad nendes küsimustes ühesed. López-Aranda (López-Aranda *et al.*, 1994) kolleegidega näiteks leidis, et ei söötme mineraalne koostis, BA hulk ega paljundusülekannete arv ei mõjutanud maasikataimede kasvu ja arengut põllul. Ka on täheldatud märgatavaid erinevusi maasikasortide vahel *in vitro* tingimuste järelmõju avaldumises põllul (Sansavini *et al.*, 1990). Mõned sordid on tõenäoliselt koekultuuri tingimuste suhtes tundlikumad kui teised.

EPMÜ Taimebiotehnoloogia Uurimiskeskuses EVIKA kasutatakse maasika tervendatud istutusmaterjali paljundamiseks merikloonide meetodit. See seisneb iga opereeritud meristeemi katseklaasitingimustes paljundatud järglaskonna säilitamises eraldi kloonina *in vitro*. Meetod võimaldab selekteerida parimate kasvu- ja saagiomadustega kloonid ning kasutada neid istutusmaterjali tootmiseks. EVIKA vanimad maasika merikloonid pärinevad aastast 1995 ja neid on igal aastal paljundatud teatud ülekannete e passaažide hulgal ning seejärel säilitatud +4 °C juures kuni järgmise paljundushooajani. Seega ulatub vanimate maasika merikloonide vanus EVIKAs 7 aastani, kuid sealjuures ei ole neid taimi pidevalt paljundatud. Eeltoodust lähtuvalt on teaduskeskuses EVIKA kasutatavate maasika meriklooni meetod mõnevõrra erinev maailmas laialt levinud mikropaljundussüsteemist, kus ühest eksplantaadist kasvatatakse ja paljundatakse teatud tsükli vältel (12–24 kuud) maksimaalne võimalik kogus taimi ning seejärel vahetatakse kogu meristeemmaterjal välja. Eesmärgiks oli uurida teaduskeskuses EVIKA säilitatavate maasika merikloonide mikrovõrsete kasvu ja arengut *in vitro* ning tütarataimede moodustumist ja kvaliteeti põllul, sõltuvalt *in vitro* söötme koostisest, meriklooni vanusest ja seisundist ning sordist.

Võtmesõnad: *in vitro*, *Fragaria* × *ananassa*, võsund, tütaraim, toitesegu.

Materjal ja meetodika

Katsed viidi läbi EPMÜ Taimebiotehnoloogia Uurimiskeskuses EVIKA 2001. aasta vältel *in vitro* geenipangas paljundatud ja säilitatud maasika merikloonidega. Katses kasutati kolme Eestis laialt levinud maasikasordi – ‘Jonsok’, ‘Bounty’ ja ‘Senga Sengana’ – merikloone.

1. *In vitro* katsed

Söötmed. Söötmete valikul lähtuti toitesoolade (nii makro- kui mikroelementide) sisaldusest. Murashige-Skoog'i (MS) (Murashige, Skoog, 1962) söötmele on iseloomulik kõrge toitesoolade kontsentratsioon ning eriti lämmastiku suur hulk lahuses. Mullini (M) (Mullin *et al.*, 1974) söötmes ammooniumlämmastikku ei esine, ka on soolade üldine kontsentratsioon märgatavalt madalam kui MS-söötmes. Kasvuhormoonide, vitamiinide ning süsivesikute sisaldus oli mõlemas söötmes ühesugune.

Sordid. ‘Jonsok’ on varajasepoolne Norras sortide ‘Senga Sengana’ ja ‘Valentine’ ristamisel aretatud sort. Puhmas jõulise kasvuga, tiheda tumerohelise lehestikuga. Tütartaimi annab rikkalikult (Libek, 1996). Koekultuuris paljuneb sort ‘Jonsok’ väga hästi. Annab rohkesti kõrvalvõrseid, kuid võrsed jäävad lühikeseks. Lehed suhteliselt väikesed, tumerohelised punaka kõrvaltooniga, võrsed punased. Mikrotaimede juurdumine rahuldav, keskmiselt moodustub 6...8 juurt mikrotaime kohta.

‘Bounty’ on hilisepoolne Kanadas ‘Jerseybelle’ ja ‘Senga Sengana’ ristamisel aretatud sort. Puhmas jõulise kasvuga, suhteliselt hõre, tütartaimi annab keskmiselt (Libek, 1996). Koekultuuris paljuneb sort ‘Bounty’ hästi. Annab rohkesti kõrvalvõrseid, võrsed pikenevad rahuldavalt. Mikrovõrsed rohelised, lehed keskmise suurusega, tumerohelised, läikivad. Mikrotaimed juurduvad hästi, keskmiselt 7–10 juurt mikrotaime kohta.

‘Senga Sengana’ on hilisepoolne sort ning aretatud 1940. a Saksamaal ‘Markee’ ja ‘Siegeri’ ristamisel. Puhmas tugeva kasvuga, veidi laiuv, keskmise suurusega tumeroheliste läikivate lehtedega. Tütartaimi annab mõõdukalt ja need moodustuvad suhteliselt hilja (Libek, 1996). Koekultuuris moodustab sort ‘Senga Sengana’ ohtralt kõrvalvõrseid. Lehed keskmisest suuremad, suhteliselt heledama tooniga kui teiste sortide lehed. Võrsed punakasrohelised, pikenevad hästi. Mikrotaimed juurduvad hästi, moodustades keskmiselt 8 juurt võrse kohta.

Tabel 1. Merikloonid ja söötmed, millel neid kultiveeriti (aastaarv näitab aega, millal kultiveeriti meristeem ja millest alates on sama materjali *in vitro* paljundatud ning säilitatud)

Table 1. Mericlones and culture media they were cultivated on (year shows the time of initiation, since when the mericlone is multiplied and preserved *in vitro*)

Sort / Cultivar					
‘Jonsok’		‘Bounty’		‘Senga Sengana’	
Merikloon <i>Mericlone</i>	Sööde <i>Culture medium</i>	Merikloon <i>Mericlone</i>	Sööde <i>Culture medium</i>	Merikloon <i>Mericlone</i>	Sööde <i>Culture medium</i>
1997	M, MS	1996	M, MS	1996	M, MS
1998	M, MS	1997	M, MS	2000	M, MS
2000	M, MS	1998	M		
		2000	M, MS		

Määramismeetodid. Intensiivse paljunemise faasis kultiveeriti kahele uuritavale söötmele kõikide sortide kõikidest merikloonidest à 30, kokku 510 mikrotaime. Kultuurid kasvasid temperatuuril +21...+23 °C 16-tunnise päevapikkuse juures. Nelja nädala möödumisel hinnati taimede seisundit ning loendati ja mõõdeti mikrovõrsed.

Külgevõrsete arv (tk). Erinevatel söötmetel kasvanud mikrotaimedel loendati kvaliteetsete kõrvalvõrsete hulk ja arvestati paljunemiskoeffitsient, s.o edasiseks paljundamiseks või juurutamiseks sobivate kõrvalvõrsete arv. Mida enam on kõrvalvõrseid, seda suurem on paljunduskoeffitsient. Kvaliteetseteks loendati mikrovõrsed, millel oli vähemalt 3 lehte koos hästiarenenud südamikupungaga.

2. Põldkatsed

In vitro taimed, igast variandist (kokku 17 varianti) 25 taime (kokku 425 taime), istutati kilerulli 15. aprillil. Põllule istutamiseks valiti ühtlane materjal, 20 taime igast variandist (kokku 340 taime). Kilerullist katsepõllule istutati taimed 5. juunil. Taimed istutati kahes korduses, à 10 taime ühel katselapil, istutustihedus 0,5×0,9 m. Taimi kõblati ja mullati käsitsi kahel korral, 27. juunil ja 3. juulil. Taimi väetati 3. juulil Kemira väetisega Fericare 14-11-25 (NPK 14-5-21) arvestusega 40–50 kg hektari kohta. Taimekaitseteid katsepõllul ei tehtud. Et eesmärk oli hinnata tütartaimede moodustumist, eemaldati kord nädalas taimedelt õied.

Määramismeetodid. Meristeemtaimede tütartaimede moodustumise ja kvaliteedi hindamisel 5.–6. septembril võeti aluseks järgmised näitajad.

Võsundite arv (tk). Võsundid jaotati loendamisel kahte fraktsiooni:

- 1) võsundid, mille küljes olid juurtega tütartaimed;

2) võsundid, millel puudusid tütarained.

Tütartaimede arv (tk). Võttes aluseks Eesti Standardiameti poolt väljaantud puuvilja- ja marjakultuuride paljundusmaterjalile kehtivad kvaliteedinõuded (Puuvilja- ja marjakultuuride..., 1999), jagati istikud järgmiselt:

- 1) tütarained, millel oli vähemalt 3 hästiarenenud lehte ja 5cm narmasjuurestik – I klassi istik;
- 2) tütarained, millel oli vähemalt 2 hästiarenenud lehte ja 4cm narmasjuurestik – II klassi istik;
- 3) saamaks teavet meristeemtaimede maksimaalsest tütaraimede moodustumise võimest, loendati ka taimealged.

Taimealgete hulka arvestati kõik võsunditel olevad väikesed kuni 2cm lehealgete, kuid juurteta lehekodarikud. Sellistest taimealgetest on võimalik edaspidi saada kvaliteetseid tütaraimi neid peenardes, kassetides või kile-ruullis juurutades ja ette kasvatades. Iga variandi kõigil taimedel hinnati nimetatud näitajad taime kaupa eraldi. Kokku hinnati 340 taime.

Katseandmete töötlus. Katseandmed töödeldi statistiliselt Excelis ühefaktorilise dispersioonanalüüsi meetodil professor E. Laugi poolt EPMÜ-s koostatud katseandmete töötlemise juhendi alusel (Lauk, 1993).

Tulemused ja arutelu

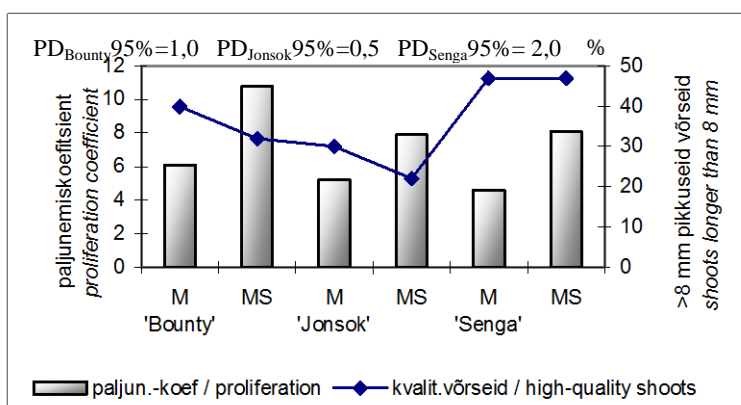
1. *In vitro* mikrotaimede paljunemis- ja juurdumisfaasi katsed

Sõltuvalt paljunemissöötmetest arenesid sortidel erineva välimusega võrsed. Koekultuuritaimedel esineb suhteliselt sageli füsioloogiline kasvuhäire, mida nimetatakse klaasistumiseks. Seda põhjustavad ebasoodsad kasvutingimused: toitesoolade ebaõige vahekord söötmes, kõrge temperatuur, liiga suur valgustugevus vm (Kevers *et al.*, 1984; Gaspar *et al.*, 1987; Ziv, 1991). Kasvuhäire väljendub lehtede keerdumises, võrsete kõverdumises, lehtede värvuse muutumises ning taimekudede üleüldises puudulikus arengus. Taimerakkudesse imendub ülemäära suures koguses vett, rakud venivad välja ning muutuvad poolläbipaistvaks. Selliste taimede aklimatiseerimine kasvuhoones tavaliselt ebaõnnestub, kuna anormaalsetest leherakkudest aurustub vesi liiga intensiivselt ning taimed kuivavad.

MS-söötmel arenes arvukalt noori, väikseid, tumerohelisi ja hapraid võrseid, millest suur osa oli klaasistunud (ligikaudu 80%). Mullini söötmel seevastu kasvasid normaalsed võrsed (klaasistunud ligikaudu 1%), millel arenesid maasika koekultuurile iseloomulikud lehekeseid. Ehkki mikrovõrsete paljunemiskoeffitsient oli Mullini söötmel väiksem kui MS-söötmel (joonis 1), esines Mullini söötmel oluliselt vähem kasvuhäiretega taimi kui MS-söötmel. Kloonide lõikes esines kõige vähem klaasistunud taimi sordil 'Senga Sengana' 1996. aasta kloonil, seda nii M- kui MS-söötmel.

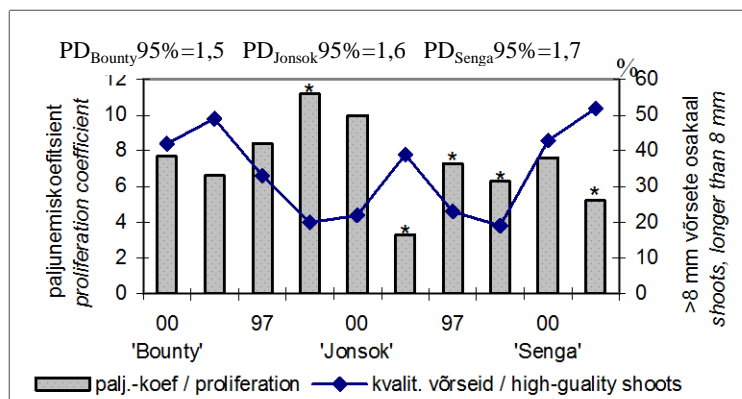
MS-söötmel olid ülekaalus lühikesed, alla 8 mm pikad mikrovõrsed, mis ei ole juurutamiseks sobilikud. M-söötmel oli pikkade, hästi arenenud lehtedega juurdumiskõlblike võrsete osakaal üldiselt suurem kui MS-söötmel. Erandiks oli vaid sort 'Senga Sengana', kus nii M- kui MS-söötmel moodustus ühepalju üle 8 mm pikkusi võrseid.

Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et suure toitesoolade sisaldusega söötmed nagu MS ei sobi maasika paljundamiseks koekultuuris. Sõltuvalt sordist ja merikloonist võib MS mõnikord sobida vananeva taimmaterjali paljunemisevõime tõstmiseks, kuid suure klaasistumise tõenäosuse tõttu seda üldkasutatavaks võtteks siiski soovitada ei saa.



Joonis 1. Söötme koostise mõju maasika mikrovõrsete kasvule
Figure 1. Influence of culture medium on growth of microshoots

Kolmel uuritud sordil avaldus meriklooni vanuse mõju mikrovõrsete paljunemisele erineva intensiivsusega. Kõige selgemini avaldus kultuuri vanuse negatiivne mõju mikrovõrsete paljunemisele sordi 'Jonsok' juures (joonis 2). 'Jonsoki' vanematel kloonidel arenes küll suhteliselt palju uusi võrseid, mis aga jäid lühikeseks ning ei sobinud seetõttu juurutamiseks. Sordi 'Bounty' puhul oli korrelatsioon koekultuuri vanuse ja paljunemise intensiivsuse vahel ebaselgem.



Joonis 2. Mikrovõrsete paljunemine sõltuvalt klooni vanusest
Figure 2. Proliferation of microshoots depending on age of mericlone

Üldiselt moodustus vanemate merikloonide eksplantaatidel küll rohkesti kõrvalvõrseid, kuid nagu sordi 'Jonsok' puhulgi, olid need juurutamiseks kõlbmatud. Kloon 'Senga Sengana' 1996 reageeris väga tundlikult MS-söötmele, kasvatades rohkesti pikki tugevaid mikrovõrseid. See tõstis võrsete keskmise pikkuse kõrgemale teiste sortide vanemate kloonide samadest näitajatest.

Merikloonide käitumine *in vitro* sõltus sordist ja kasvufaasist, millesse nad koekultuurina arenedes enne säilitusperioodi algust jõudnud olid. Kloonid, mis eelnevate aastate jooksul olid jõudnud läbida proliferatsioonifaasi, andsid juurdumisvõimelisi regenerante ning olid uurimuse alustamise ajaks jõudnud juurdumisfaasi. Näiteks meristeemklonid 'Jonsok' 1998, 'Bounty' 1998 andsid suhteliselt väikese uute võrsete produktsiooni võrreldes kloonidega, mis olid püsinud aktiivse paljunemise faasis ning ei olnud veel jõudnud juurdumisfaasi.

Sorditi avaldab maasika koekultuuri vanus ja seega ka paljunduskordade arv erinevat mõju. Paljuski sõltub paljunduskoeffitsient kultuuri kasvufaasist. Kui vanemaid koekultuure suudetakse säilitada proliferatsioonifaasis, siis võib ka 2–3 aastat vana kultuur näidata suhteliselt head paljunemise intensiivsust (meie katses näiteks merikloonid 'Bounty' 1997 ja 'Senga Sengana' 1996).

2. Põldkatsed

Võsundid (roomavad varred) arenevad lehekodariku alumiste lehtede kaenlapungadest. Võsundid on maasika vegetatiivsed paljunemisorganid. Rõhtsad, pikkade sõlmevahedega võsundite sõlmevahed juurduvad ja annavad alguse uuele isendile – tütaraimele (Ilus, 1981).

Ühe emataime võsundite ja tütaraimede arv oleneb sordist, emataime tervislikust seisundist ja vanusest ning ka ilmastikust ja agrotehnikast. Mida tugevamini on puhmas arenenud, seda suurem on tema võsundite moodustumise võime.

Antud katses ei sõltunud võsundite arv sortide keskmisena söötme koostisest (tabel 2). Eraldi sortide lõikes moodustus võsundeid usutavalt enim sordil 'Senga Sengana' MS-söötmel, sordil 'Bounty' aga M-söötmel kasvanud taimedel. Sordil 'Jonsok' moodustus küll MS-söötmel kasvanud taimedel 0,7 võsundit taime kohta enam kui M-söötmel kasvanud taimedel, mis aga ei osutunud usutavaks (PD95% 1,3).

Tabel 2. Söötme koostise mõju maasika võsundite ja tütaraimede moodustumisele (3 sordi keskmisena)
Table 2. Influence of culture medium on formation of strawberry runners and daughter plants (average of 3 cultivars)

Söötme variant Culture medium	Võsundite arv Number of runners		Tütaraimede arv Number of daughter plants	Taimealgete arv Number of preplants
	kokku total	sh tütaraimedega with daughter plants		
M	13,0	9,6	19,9	26,1
MS	13,4	9,6	18,5	21,9
PD95%	0,5	1,4	2,5	1,1

Sõltumata erinevusest võsundite arvus oli tütaraimedega võsundite osakaal võsundite üldarvus protsentuaalselt võrdne mõlema söötme variandis sortidel 'Jonsok' ja 'Bounty'. Sordil 'Senga Sengana' oli küll MS-söötmel regeneerunud taimedel 3,2 võsundit enam kui M-söötmel regeneerunud taimedel, kuid samas tütaraimedega võsundite protsent oli M-söötmel (72%) suurem kui MS-söötmel (57%).

Antud andmetest nähtub, et võsundite arv taime kohta sõltus sordist enam kui söötmekoostisest. Söötmekoostise usutav mõju tütaraiemega võsundite moodustumisele ilmnes sordil 'Jonsok'.

Kirjanduse andmetel moodustavad kõige tugevamaid ja hästi arenenud tütaraiemi üheaastased maasikataimed. Maksimaalne arv tütaraiemi areneb aga kaheaastastel taimedel. Emataim võib anda 10...30 või rohkemgi võsundit. Igal võsundil võib areneda 1...7, vahel enamgi tütaraieme (Ilus, 1981).

Kevadsuvised istutuse korral, nagu meie katses, algas võsunditel tütaraiemede moodustumine alles augusti alguses ja lõppes kuu hiljem tütaraiemede ülesvõtmisega. Seetõttu jäi kasvuaeg lühikeseks ning meristeemtaimede maksimaalset tütaraiemede arvu saab hinnata alles järgmisel sügisel.

Olenevalt söötmekoostisest moodustus sortidel 'Senga Sengana' ja 'Bounty' usutavalt enim tütaraiemi M-söötmel. Sordi 'Jonsok' korral oli tulemus erinev. Sortide keskmisena moodustus tütaraiemega võsundeid mõlemal söötmel kasvanud taimedel võrdselt (9,6). Kuid samas saadi M-söötmel kasvanud taimedelt võsundi kohta 1,4 tütaraieme.

Tervendatud maasika emataimede taimealged on väärtuslik materjal tütaraiemede tootmisel. Sellised väikesed taimealged vajavad aga edasist juurutamist ja tütaraiemede kasvatamist. Taimealgeid moodustus sortide keskmisena usutavalt enim M-söötmel kasvanud taimede võsunditel.

Näitajatest järeldub, et meristeemtaimede paljundamisel on soovitatav kasutada väiksema mineraalainete kontsentratsiooniga söödet (M-sööde), kuna sellisel söötmel kasvanud taimede võime moodustada tütaraiemi oli parem kui kõrgema mineraalainete kontsentratsiooniga söötmel kasvanud taimedel.

Olenevalt meristeemi kultiveerimise aastast võrreldi antud katses 1, 3, 4 ja 5 aastat järjepidevalt *in vitro* tingimustes paljundatud ja säilitatud merikloone. Mõnede autorite andmetel on produktiivsete emataimede saamiseks vajalik *in vitro* lähtematerjal uuendada vähemalt iga kahe aasta järel (Jemmali *et al.*, 1995).

Tabelist 3 on näha, et sortide keskmisena võsundite arv taime kohta kokku oli vanemate merikloonide korral suhteliselt sarnane (13,1...13,9 võsundit taime kohta). Vastupidiselt kirjanduse andmetele (Jemmali *et al.*, 1995) oli üheaastaste merikloonide taimede võsundite arv usutavalt väiksem kui 3- või 4-aastaste merikloonide taimede võsundite arv. Seega ei mõjutanud meriklooni vanus võsundite moodustumist negatiivselt. Tütaraiemega võsundite moodustumine sõltuvalt meriklooni vanusest oli usutavalt positiivne 4 aastat *in vitro* tingimustes paljundatud merikloonidel.

Sordil 'Jonsok' moodustus nii võsundeid kui tütaraiemi usutavalt enim kõige vanema (4 aastat) meriklooni taimedel. 1- ja 3-aastaste merikloonide samad näitajad olid praktiliselt võrdsed. Seega võib väita, et pikaajaline samade meristeemtaimede paljundamine *in vitro* ei mõjutanud sordi 'Jonsok' tütaraiemede moodustumise võimet negatiivselt suunas.

See väide kehtib ka sordi 'Senga Sengana' kohta, kus võrdluses olid ainult kahel, 1996. ja 2000. aastal kultiveeritud merikloonid. Tütaraiemede arv taime kohta 1996. aastal kultiveeritud merikloonil oli usutavalt 1,9 tütaraieme võrra suurem kui 2000. aastal kultiveeritud merikloonil.

Sordil 'Bounty' oli võimalik katsesse valida 4 erineva vanusega merikloonide taimed. Sarnaselt teiste sortidega moodustus ka sordil 'Bounty' usutavalt enim võsundeid ja tütaraiemi kõige vanema (5 aastat) meriklooni taimedel. Seega võib kokkuvõtvalt väita, et meriklooni vanus ei vähendanud meristeemtaimede produktiivsust tütaraiemede moodustumises.

Tabel 3. Meriklooni vanuse mõju maasika võsundite ja tütaraiemede moodustumisele (3 sordi keskmisena)
Table 3. Influence of the age of mericlone on formation of strawberry runners and daughter plants (average of 3 cultivars)

Meriklooni kultiveerimise aeg <i>Year of cultivation of meristem</i>	Võsundite arv <i>Number of runners</i>		Tütaraiemede arv <i>Number of daughter plants</i>	Taimealgete arv <i>Number of preplants</i>
	kokku <i>total</i>	sh tütaraiemedega <i>with daughter plants</i>		
1996	13,1	9,6	19,1	23,0
1997	13,9	11,1	20,8	24,9
1998	13,9	9,8	21,5	31,2
2000	12,4	9,1	17,2	21,0
PD 95%	0,8	1,1	0,8	1,3

Sügisel rajatud emataimede istanduse taimedel hakkavad võsundid ilmuma juba järgmise aasta mais. Juunis võsundite kasv elavneb ja saavutab haripunkti pärast saagi koristamist juuli lõpul, augusti esimesel poolel, et seejärel jälle vaibuda. Septembris uute võsundite teke katkeb.

Kõnealusel katses istutati kilerullitaimed põllule 5. juunil. Esimesed võsundid alustasid kasvu juuli alguses. Võsundite ja tütaraiemede moodustumist hinnati septembri alguses. Seega ajaliselt toimus võsundite ja tütaraiemede moodustumine vähem kui kahe kuu jooksul. Katses oli kolm erineva kasvuajaga sorti: varajasepoolne 'Jonsok', hilisepoolne 'Senga Sengana' ning hiline 'Bounty'. Kasvuaja pikkus on sordiomane tunnus, millest omakorda sõltub nii marjasaagi kujunemine kui ka võsundite ning tütaraiemede areng ja arengu kiirus.

Tabelist 4 on näha, et enim võsundeid ja tütaraimedega võsundeid moodustus varajasepoolsel sordil 'Jonsok'. Ka kirjanduse andmetel moodustuvad sordil 'Jonsok' võsundid kiiremini kui hilisematel sortidel (Libek, 1996).

Tabel 4. Võsundite, tütaraimede ja taimealgete arv taime kohta sõltuvalt sordist

Table 4. Number of runners, daughter plants and pre-plants per plant depending on cultivar

Sort Cultivar	Võsundite arv Number of runners		Tütaraimede arv Number of daughter plants	Taimaalgete arv Number of pre-plants
	kokku total	sh tütaraimedega of which are with daughter plants		
'Jonsok'	15,4	12,7	53,1	27,9
'Senga Sengana'	11,2	7,1	35,4	20,8
'Bounty'	12,4	9,0	39,5	22,8
PD 95%	0,6	0,9	1,4	1,8

Sortide 'Senga Sengana' ja 'Bounty' võsundite moodustumine oli aeglasem ning seetõttu oli ka tütaraimedega võsundeid vähem kui sordil 'Jonsok'. Olenevalt sordist moodustasid taimealged kuni poole võimalikest tütaraimedest

Kokkuvõte

In vitro tingimustes meristeemtaimede arengu ja kvaliteedi osas osutus efektiivsemaks Mullini sööde.

Mullini söötme positiivne efekt ilmnis ka põldkatses, soodustades tütaraimede ning tütaraimedega võsundite moodustumist.

Meriklooni vanuse mõju *in vitro* tingimustes sõltus koekultuuri kasvufaasist enam kui meriklooni vanusest ehk paljundusülekannete arvust. Kui mikrovrõrseid suudetakse säilitada aktiivse paljunemise faasis, siis võib ka 2–3 aastat *in vitro* kasvatatud kultuur anda intensiivselt kõrvalvrõrseid, aklimatiseeruda edukalt ning kasvatada põllul suurel hulgal tütaraimi.

Tervendatud maasika meristeemtaimede võsundite ja tütaraimede moodustumine ja kvaliteet sõltus sordist enam kui meriklooni vanusest.

Tänuavaldus

Uurimus on teostatud EAS Eesti Tehnoloogiaagentuuri toetusel.

Kirjandus

- Boxus, P., Larvor, P. Workshop on strawberry plants issued from tissue culture. – The European Communities Biol. Series, 1987.
- Donnelly, D. J., Stace-Smith, R., Mellor, F. C. *In vitro* culture of three *Rubus* species. – Acta Horticulture, 112, p. 69...75, 1980.
- Gaspar, T., Kevers, C., Debergh, P. C., Maene, L., Pâques, M., Boxus, P. Vitrification: Morphological, physiological and ecological aspects. – Cell and Tissue Culture. Bonga, J. M., Durzan, D. J. (eds). – Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1, p. 152...166, 1987.
- Ilus, L. Maasikas. Tallinn, 1981. – 134 lk.
- Jemali, A., Boxus, Ph., Kevers, C., Gaspar, Th. Flowering abundance of strawberry depending on the number of subcultures *in vitro*. Relationship with growth, rooting and peroxidase activity. – Lumsden, P. J., Nicholas, J. R., Davies, W. J. (eds): Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. – Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, p. 356...362, 1995.
- Kevers, C., Coumans, M., Coumans-Gilles, M. F., Gaspar, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. – Physiol. Plant., 61, p. 69...74, 1984.
- Lauk, E. Juhend katseandmete töötlemiseks. Tartu, 1993. – 24 lk.
- Libek, A. Maasikakasvatus. – Eesti Aiandusliit, Tallinn, 1996. – 63 lk.
- López-Aranda, J. M., Pliego-Alfaro, F., López-Navidad, I., Barceló-Munoz, M. Micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the *in vitro* and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. – J. Hortic. Sci., 69(4) p. 625...637, 1994.

- Marcotrigiano, M., Swartz, H. J., Gray, S. E., Tokarcik, D., Popenoe, J. The effect of benzyl amino purine on the *in vitro* multiplication rate and subsequent field performance of tissue-culture propagated strawberry plants. – *Advances in strawberry production*, 3, p. 23...25, 1984.
- Mullin, R. H., Smith, S. H., Frazier, N. W., Schlegel, D. E., McCall, S. R. Meristem culture frees strawberries of mild yellow edge, pallidosis and mottle diseases. – *Phytopathology*, 64, p. 1425...1429, 1974.
- Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. – *Physiologia plantarum*, 15, p. 473...497, 1962.
- Navatel, J. C. La production des plants d fraisières en France. – *CTIFL-Documents*, 77, p. 12...16, 1983.
- Pennell, D. Strawberry micropropagation within the UK. – *In vitro* culture of strawberry plants. (Boxus, P. and Larvor, P., Eds.). Commission of the European communities. Report EUR 10781 EN-ER, p. 27...34, 1987.
- Puuvilja- ja marjakultuuride paljundusmaterjali kategooriate, puuvilja- ja marjakultuuride paljundusmaterjali tootmisega tegelevate laboratooriumite akrediteerimise, puuvilja- ja marjakultuuride paljundusmaterjalide pakendamise, turustamise korra kinnitamine. PÕMm nr. 18, 1999. Riigi Teataja 100, 1254, 1999.
- Rancillac, M., Nourrisseau, J. G., Navatel, J. C., Roudeillac, P. Incidence de la multiplication *in vitro* sur le comportement du plant de fraisier en France. – *In vitro* culture of strawberry plants. (Boxus, P. and Larvor, P., Eds.). Commission of the European communities. Report EUR 10781 EN-ER, p. 55...73, 1987.
- Sansavini, S., Rosati, P., Gaggioli, D., Toschi, M. F. Inheritance and stability of somaclonal variations in micropropagated strawberry. – *Acta Hort.*, 280, p. 375...384, 1990.
- Ziv, M. Quality of micropropagated plants – vitrification. – *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 27P, p. 64...69, 1991.

Productivity of Disease-free Strawberry Plants Influenced by Culture Medium and Mericlone

V. Vasar, K. Kotkas

Summary

The productivity of strawberry plants depends highly on the quality of initial planting material. Meristem method is widely used in production of disease-free high yielding strawberry mother plants. Sometimes the *in vitro* conditions, especially the composition of culture medium, and the number of *in vitro* subcultures, are said to affect the field behavior of strawberry plants. On the other hand, there are data that indicate the mineral composition of media, amount of BA added or the number of subcultures, do not influence the subsequent growth and yield of strawberries on the field. It is also known that there may be remarkable differences in tolerance to meristem culture conditions between genotypes.

The aim of our project was to study the growth and development of microshoots *in vitro* and the formation and quality of daughter plants depending on the composition of culture medium, age of mericlone and genotype-specific growth habits.

Materials and Methods

Microshoots of three cultivars – ‘Jonsok’, ‘Bounty’ and ‘Senga Sengana’ – were introduced into tissue culture in 4 different years and preserved *in vitro* in EAU Plant Biotechnological Research Centre EVIKA genebank. The tested mericlones were preserved either 5, 4, 3 or 1 year *in vitro*, meaning that in each year explants were multiplied actively during 4...5 months and then maintained at slow growth conditions at +4 °C until the next season.

In order to study the influence of mineral composition of culture media on the growth *in vitro*, the microshoots were cultivated either on Murashige-Skoog (MS) medium (high salt concentration) or on Mullin’s medium (lacks ammonium nitrate and contains low salt concentration). Actively proliferating microshoots of each mericlone were cultivated on both media, 30 explants in each treatment. After 4 weeks the number of newly grown shoots was counted, the proliferation rate calculated and the length of shoots measured.

Proliferated shoots were rooted *in vitro*, acclimatized in greenhouse and planted in the field in order to study the subsequent influence of *in vitro* growth conditions and mericlone age on the field behavior of mericlones. Exactly 20 plants of each treatment of each mericlone were planted in the field. The number of runners, daughter plants and pre-plants was counted during the autumn season after planting.

Results

MS medium caused active proliferation but the shoots remained too short and fragile for rooting and the level of vitrification was high (ca 80%) (Figure 1). On Mullin's medium the proliferation level was lower but shoots elongated enough for successful rooting and there was much less vitrified shoots counted (only ca 1%). Among mericlones, the lowest number of vitrified shoots developed on clone 'Senga Sengana 1996'.

The age of mericlone affected tested genotypes with different intensity. The negative influence of the age of mericlone was most evident on cv 'Jonsok' (Figure 2). The older clones of 'Jonsok' had relatively many but short shoots that were unsuitable for rooting. That was a general tendency in case of old mericlones.

On the base of our observations the number of runners formed in the field did not depend on the composition of culture medium (Table 2). On cvs 'Senga Sengana' and 'Bounty' the number of daughter plants was higher on plants grown on Mullin's than of those grown on MS medium *in vitro*. Differently, cv 'Jonsok' formed equally many daughter plants on bushes initially grown either on MS or Mullin's medium. As an average of all 3 cultivars, the number of runners formed on older mericlones was higher than on 1-year old mericlone (Table 3). Among all cultivars the oldest mericlone formed the highest number of runners and daughter plants in the field conditions.

Conclusions

Our results indicate that media containing high concentration of mineral salts (in our project MS) are not suitable for strawberry micropropagation. Depending on genotype and mericlone high salt concentration can be proper to proliferate those mericlones that have been maintained *in vitro* for many years but because of high likelihood of vitrification it cannot be recommended as practical method.

The growth and proliferation of mericlones depended on the growth stage that they had reached to for the moment of preservation. Those clones that had passed the proliferation stage and had gone over to rooting stage showed a low ability to proliferate. If cultures can be maintained in an actively proliferating stage, can even 2...3 years old mericlone guarantee a high production of new shoots.

The field behavior of strawberry plants indicated that the low concentration of mineral salts in culture medium favors the runner and daughter plant production in the field. The age of mericlone does not have a negative influence on plant growth and daughter plant development.