

LÄMMASTIKU JA TSÜTOKINIINIDE MÕJU MAGUSKIRSI (*Prunus avium* L.) PALJUNEMISELE JA PIKKUSKASVULE *IN VITRO*

V. Vasar

Sissejuhatus

Maguskirsi ehk murelipuude kasvatamine kodu- ja taluaedades on viimastel aastatel üha populaarsemaks muutunud. Võib aga juhtuda, et pärast istiku muretsemist sureb puu ootamatult. Selle põhjuseks on maguskirsile kui liigile iseloomulik pookealuse ja poogendi vastastikune sobimatus (Childers, 1976). Probleemi saaks lahendada, kasvatades omajurseid istikuid. Omajursete istikute kasvatamine on maailmas populaarsust leidnud näiteks õunapuude (Zimmermann, 1981) ja virsikupuu paljundamisel (Erez, 1980). Kahjuks on maguskirsi sortidel väike juurdumisvõime ning seetõttu on neid raske ja aeganõudev pistikutest paljundada. Omajursete maguskirsisortide paljundamine mikropaljundusmeetodil on paljutõotav võimalus rahuldada aiapidajate ning talunike soovi murelipuude järele.

Viljapuude mikrovõrsete paljunemisele ja kasvule katseklaasi tingimustes avaldavad suurt mõju nii söötmesse lisatud kasvuregulaatorid kui ka see, millises vormis on söötmes üks olulisem taimetoitainet – lämmastik.

Enamik koekultuuris kasvatatavaid taime kudesid ja organeid omastab lämmastikku efektiivsemalt söötmetest, mis sisaldavad nii nitraat- kui ammooniumlämmastikku (George, 1993). Oluline on aga leida kõige optimaalsem $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ vahekorra, mis tagaks eduka kasvu ja arengu *in vitro*. Nii on näiteks Riffaud ja Cornu (1981) leidnud, et ammooniumlämmastiku kõrge kontsentratsioon söötmes võib põhjustada maguskirsi mikrovõrsete anomaalset arengut ja klaasistumist katseklaasi tingimustes.

Uute viljapuuliikide ja -sortide koekultuuri viimisel on tihti raske ennustada, milline tsütokiniin on paljunemiseks sobivaim. Tuleb silmas pidada, et tsütokiniinide kõrge kontsentratsiooni korral söötmes võivad mikrovõrsete arengus tekkida anomaaliad (Pierik, 1987). Maguskirsi paljundamisel *in vitro* on üheks levinumaks ja mikrovõrsete paljunemist efektiivsemalt mõjutavaks tsütokiniiniks bensüüladeniin (BA) (Dodds, 1983). Looduslik tsütokiniin N^6 -(2-isopentüül)adeniin (2iP) on praktikas vähem kasutatust leidnud.

Käesoleva uurimuse eesmärgiks oli võrrelda maguskirsi mikrovõrsete paljunemist kahe erineva lämmastiku kontsentratsiooniga söötmel ning samuti tsütokiniinide BA ja 2iP mõju maguskirsi mikrovõrsete pikkuskasvule *in vitro*.

Materjal ja meetodika

Katsed korraldati Eesti Põllumajandusülikooli Taimebiotehnoloogia Uurimiskeskuses EVIKA ajavahemikul veebruar–märts 1997. Katsematerjalina kasutati teaduskeskus EVIKA geenipangas *in vitro* säilitatavaid maguskirsi sorte 'Meelika' ja 'Rubiin'. $+4\text{ }^\circ\text{C}$ juures säilitatud võrsepuhmakesed viidi enne katse algust kasvutsükli sobivatesse tingimustesse ($+22\text{...}+24\text{ }^\circ\text{C}$, päeva pikkus 16 h) ning kanti värsketele söötmele üle 3 korda 4-nädalaste intervallidega. Paljundussöötmena kasutati Murashige-Skoogi toitesegu (MS) (Murashige ja Skoog, 1962), millele lisati $4,44\text{ }\mu\text{M/l}$ BA-d ja $0,49\text{ }\mu\text{M/l}$ indolüülvõihapet (IBA). Söötme pH viidi enne agari lisamist $0,1\text{ N NaOH}$ lahusega tasemele 5,6 ning segu autoklaaviti $0,7\text{ atm}$ juures 30 minutit. Katsekultuurid kasvasid reguleeritavate kliimaseadmetega fütotronis temperatuuril $+22\text{...}+24\text{ }^\circ\text{C}$ päeva pikkusel 16 h.

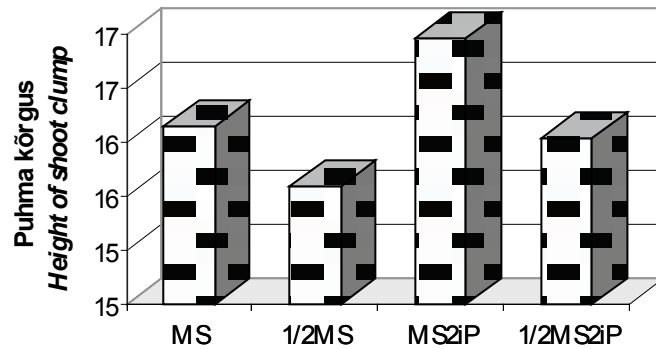
Katsetati nelja erinevat toitesegu koostist. Juba kasutusel olnud MS segu, mis sisaldas $20,6\text{ mM/l}$ NH_4^+ ning $39,4\text{ mM/l}$ NO_3^- , võrreldi söötmelega, mille lämmastikusisaldus oli madalam, vastavalt $10,3\text{ mM/l}$ NH_4^+ ning $29,1\text{ mM/l}$ NO_3^- . Mõlemal juhul lisati söötmesse kas $4,44\text{ }\mu\text{M/l}$ BA-d või $49,21\text{ }\mu\text{M/l}$ 2iP-d.

Hoogsalt kasvavad võrsepuhmakesed jagati steriilses keskkonnas 2 lehekaenla pungaga võrselõikudeks, mis istutati 250 ml kolbidesse, igasse kolbi 4 eksplantaati. Paljunemisperioodi vältel hoiti kultuure fütotronis temperatuuril $+22\text{...}+24\text{ }^\circ\text{C}$ päeva pikkusega 16 h.

Katseandmete analüüsimisel arvestati kahe sordi keskmisi tulemusi.

Tulemused

4 nädala möödudes oli mikrovõrsetel kõigis katsevariantides arenenud vähemalt 4 kõrvalvõrset. Nii madalama kui normaalse lämmastiku kontsentratsiooni juures olid mikrovõrsetel arenenud normaalsed lehed ning võrsed olid üle 14 mm pikad (joonis 1).



Joonis 1. Erinevate tsütokiniinide ja lämmastiku koguse mõju maguskirsi mikrovrsete puhma kõrgusele (mm). MS – täiskontsentratsiooniga MS-sööde, millele lisati BA; 1/2MS – MS-sööde, milles lämmastiku kogus alandati 1/2-le + BA; MS2iP – MS-sööde, millele lisati 2iP; 1/2MS2iP – MS-sööde 1/2 koguse lämmastikuga + 2iP
 $p_{0,05} = 4,19$

Figure 1. Effect of nitrogen concentration and cytokinin source on average height of sweet cherry shoot clumps (mm).

MS – full-strength MS medium supplemented with BA; 1/2MS – MS medium with 1/2 concentration of nitrogen + BA; MS2iP – full-strength MS medium supplemented with 2iP; 1/2MS2iP – MS medium with 1/2 concentration of nitrogen + 2iP

$p_{0,05} = 4,19$

Väiksema lämmastikukoguse korral olid võrsed üldiselt lühemad kui suurema kogusega variantides. Ka taimede välimuses oli märgata väikest erinevust. 1/2 lämmastiku kontsentratsiooni korral olid mikrovrsetel arenenud lehed heledamad võrreldes tumeroheliste lehtedega nendel võrsetel, mis kasvasid tavalisel MS-söötmel.

4,44 $\mu\text{M/l}$ BA-d soodustas mikrovrsete paljunemist sõltumata söötmes sisalduva lämmastiku kogusest (joonis 2). Võrsete pikkuskasv seevastu oli BA-variantides tagasihoidlik võrreldes 2iP-variantidega. 2iP põhjustas usutavalt mikrovrsete pikenemist, kuid samal ajal pidurdas tugevalt kõrvalvõrsete moodustumist. Taimede välimuses täheldati samuti erinevusi. Kasvuregulaatorina 2iP-d sisaldanud söötmel kasvanud võrsed olid puitunumad, tugevamad ning katseklaasist väljaistutamisel aklimatiseerusid kasvuhoones paremini.

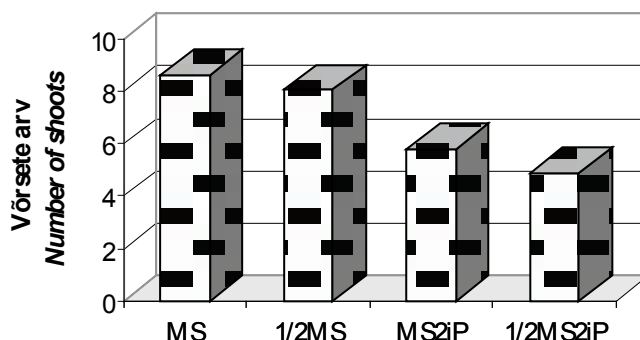
Arutelu

Toitesoolade kontsentratsioon söötmes on viljapuude mikropaljundust mõjutavatest faktoritest üks olulisemaid. Mõnede kultuuride kasvatamisel *in vitro* on selgunud, et madalama toitainetesisaldusega söötmel on taimede morfogenees parem kui nn. kangemal toitesegul (Bartish, Korkhovi, 1997).

Antud katses selgus, et BA-d sisaldanud söötmel pidurdas madalam lämmastiku kontsentratsioon võrsete pikkuskasvu puhmas, kuid ei mõjutanud usutavalt mikrovrsete paljunemist. Toitainete poolest rikkad toitesegud, nagu ka MS, võivad vahel põhjustada mõnede taimeliikide klaasistumist *in vitro* (Paques, Boxus, 1987). Ammooniumlämmastiku koguse alandamine söötmes suurendas näiteks paju, ploomi ja kaktuse liikide mikrovrsete puitumist ning alandas klaasistumise esinemist *in vitro* (Daguin, Letouzé, 1986; Leonhardt, Kandeler, 1987). Antud katses oli vaid mõni MS-söötme kasvanud mikrovrse klaasja välimusega. Seetõttu pole selge, kas klaasistumine oli tingitud lämmastiku kõrgemast kontsentratsioonist või põhjustas seda mõni muu kasvufaktor.

On teada, et tsütokiniinid stimuleerivad valgu sünteesi taimes. Koos auksiinidega toitesegusse lisatuna stimuleerivad tsütokiniinid rakkude jagunemist, pidurdavad apikaalse dominantsuse teket ning katkestavad alumiste lehekaenla pungade puhkeperioodi (George, 1993). On teada, et viljapuude adventiivvõrsete eduka regenereerumise tingimuseks on optimaalne tsütokiniinide ja auksiinide vahekord söötmes. Enamasti on paljundussöötmetes tsütokiniinid kõrges ja auksiinid madalas kontsentratsioonis (Theiler-Hedtrich, Theiler-Hedtrich, 1990; Yepes, Aldwinckle, 1994).

Mõnede autorite arvates põhjustab BA *Prunus*'e liikide mikrovrsete paljunemist katseklaasi tingimustes, samal ajal kui 2iP-ga söötme kasvatades eksplantaadist vaid üks võrse (Martinelli, 1985). Meie katsed kinnitavad seda väidet, näidates, et 2iP-l on võrsete pikenemist ja puitumist soodustav mõju, samal ajal kui BA stimuleerib kõrvalvõrsete teket ja mikrovrsete paljunemist maguskirsil. BA paljunemist soodustavat mõju stimuleeris söötmesse lisatud indolüülvõihape (IBA).



Joonis 2. Erinevate tsütokiniinide ja lämmastiku koguse mõju maguskirsi mikrovõrsete arvule puhmas. MS – täiskontsentratsiooniga MS-sööde, millele lisati BA; 1/2MS – MS-sööde, milles lämmastiku kogus alandati 1/2-le + BA; MS2iP – MS-sööde, millele lisati 2iP; 1/2MS2iP – MS-sööde 1/2 koguse lämmastikuga + 2iP
 $p_{0,05} = 4,19$

Figure 2. Effect of nitrogen concentration and cytokinin source on number of shoot per clump. MS – full-strength MS medium supplemented with BA; 1/2MS – MS medium with 1/2 concentration of nitrogen + BA; MS2iP – full-strength MS medium supplemented with 2iP; 1/2MS2iP – MS medium with 1/2 concentration of nitrogen + 2iP
 $p_{0,05} = 4,04$

Taimedes oleva ensüümi tsütokiniini oksüdaas lagundab tsütokiniinide zeitiin ja 2iP külghelas oleva kaksiksideme, mistõttu nad kaotavad oma aktiivsuse (Horgan, 1987; Chatfield, Armstrong, 1988). 2iP kiire lagundamine ensüümi poolt võib olla põhjuseks, miks see ühend ei soodusta viljapuude, sealhulgas ka maguskirsi mikrovõrsete paljunemist.

Klaasistumine näib olevat mõnede viljapuude mikropaljunduses tõsiseks probleemiks. Katsetes õunapuu ja ploomi pookealustega *in vitro* on soovitatud paljunemissöötmes BA asendada 5 mg/l 2iP-ga, et ära hoida klaasistumist (Werner, Boe, 1980; Wilkins, Dodds, 1983). Antud katsetes ei täheldatud mingeid klaasistumise tunnuseid variantides, kus tsütokiniinina kasutati 2iP-d, BA-variantides esines üksikuid klaasjaid adventiivvõrseid. Seetõttu võib 2iP kasutamine maguskirsi mikropaljunduses olla õigustatud juhul, kui BA põhjustab klaasistumist. Sellega võib saavutada, et võrsed pikenevad, puituvad ning seejärel juurduvad edukamalt.

Järeldused

Et lämmastiku kogus BA-söötmetes usutavalt mikrovõrsete paljunemist ei mõjutanud, võib öelda, et mõnel juhul võib maguskirsi mikrovõrsete paljundussöötmes kasutada madalamat lämmastiku kontsentratsiooni. See võimaldab kokku hoida mikropaljundusele tehtavaid kulutusi, mõjutamata seejuures paljunduse efektiivsust ja taimmaterjali kvaliteeti. Katsetulemused näitavad, et maguskirsi paljunemiseks *in vitro* on kõige sobivam tsütokiniin BA. 2iP sobib kasutamiseks viimasel ülekandel enne võrsete juurduma panemist, et mikrovõrsed pikeneksid ja puituksid.

Tsütokiniini 2iP pidurdav mõju maguskirsi kõrvalvõrsete moodustumisele katseklaasi tingimustes vajab veel täiendavat uurimist, enne kui seda võib soovitada maguskirsi massiliseks kasvatamiseks *in vitro*.

Kirjandus

- Bartish I. V., Korkhovoi V. I. The composition of nutrient medium and the efficiency of shoot induction *in vitro* from apple leaf explants. – Rus. J. Pl. Phys., vol. 44, No. 3, p. 381...385, 1997.
- Chatfield J. M., Armstrong D. J. Cytokinin oxidase from *Phaseolus vulgaris* callus cultures. – Affinity for concanavalin A. Plant Physiol, vol. 88, p. 245...247, 1988.
- Childers N. F. In: Modern Fruit Science. Horticultural Publication, Rutgers University, New Jersey, p. 421...422, 1976.
- Daguin F., Letouzé R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. – Physiol Plant, vol. 66, p. 94...98, 1986.
- Dodds J. H. Tissue Culture of Trees. – The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 1983. – 148 p.
- Erez A. Acta Hort. vol. 114, p. 258...291, 1980.
- George E. F. Plant Propagation by Tissue Culture Part 1. The technology. – Exegetics Limited, 1993. – 574 p.
- Horgan R. Plant growth regulators and the control of growth and differentiation in plant tissue cultures. – In: Green et al. (eds.), p. 135...149, 1987. (q.v.)

- Leonhardt W., Kandeler R. Ethylene accumulation in culture vessels – a reason for vitrification. – Acta Hort, vol. 212, p. 223...229, 1987.
- Martinelli A. Factors affecting *in vitro* propagation of the peach almond hybrids 'Hansen 536'. – Acta Hort, vol. 173, p. 237...244, 1985.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. – Physiol Plant, vol. 15, p. 473...497, 1962.
- Paques M., Boxus P. A model of learn "vitrification", the rootstock apple M.26 present results. – Acta Hort, vol. 212, p. 193...210, 1987.
- Pierik R. L. M. *In Vitro Culture of Higher Plants*. – Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987. – 344 p.
- Riffaud J. L., Cornu D. Utilisation de la culture *in vitro* pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés en forêt. – Agronomie 1, p. 633...640, 1981.
- Zimmermann R. H. Newsletter. – Int. Ass. Pl. Tissue Cult., vol. 33, p. 17, 1981.
- Theiler-Hedtrich C., Theiler-Hedtrich R. Influence of TDZ and BA on adventitious shoot regeneration from apple leaves. – Acta Hort., vol. 280, p. 195...199, 1990.
- Werner E., Boe A. A. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. – Hort Sci., vol. 15, p. 509...510, 1980.
- Wilkins C. P., Dodds J. H. Tissue culture propagation of temperate fruit trees. – In: Dodds Jn (Ed) *Tissue Culture of Trees*. The Avi Publishing Company, Inc., Connecticut, p. 56...79, 1983.
- Yepes L. M., Aldwinckle H. S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple and effect of antibiotics in morphogenesis. – Plant Cell, Tissue, Organ Cult., vol. 37, No. 3, p. 257...269, 1994.

Influence of Nitrogen and Cytokinin Source on *Prunus avium* L. Proliferation and Elongation *in vitro*

V. Vasar

Summary

The aim of the study was to determine the influences of lowered nitrogen concentration and 2iP vs. BA on sweet cherry (*Prunus avium* L.) shoot proliferation and elongation. Full-strength solid MS-medium, containing 20.6 mM l⁻¹ NH₄⁺ and 39.4 mM l⁻¹ NO₃⁻ was compared with MS-medium, supplied with 10.3 mM l⁻¹ NH₄⁺ and 29.1 mM l⁻¹ NO₃⁻. In both cases either 4.44 μM l⁻¹ BA or 49.21 μM l⁻¹ 2iP was added into medium. Lowered nitrogen concentration did not affect the proliferation efficiency, but inhibited shoot elongation. There was slight difference in plantlets appearance *in vitro* – shoots on full-strength MS medium had dark-green leaves while in lower nitrogen concentration light-green leaves developed. BA induced shoot proliferation, not depending on the concentration of nitrogen in culture medium. 2iP inhibited the formation of adventitious shoots but had a strong elongating effect. Shoots treated with 2iP were more ligneous and acclimatised more successfully when transferred to greenhouse for rooting *in vivo*.