

ERINEVATE SÜSIVESIKUTE KASUTAMINE MAGUSKIRSI (*Prunus avium* L.) MIKROPALJUNDUSES

V. Vasar

Sissejuhatus

Autotroofsed rakud on võimelised fotosünteesi käigus iseseisvalt assimileerima süsinikdioksiidi ning seeläbi rahuldama taime vajaduse süsivesikute järele (Bergmann, 1967; Larosa *et al.*, 1981). Enamik koekultuuride meetodil paljundatavatest taimedest, nende organitest või kudedest ei ole katseklaasitingimustes autotroofsed. Et tagada taimealgete normaalne kasv ja areng, tuleb kunstlikku söötmesse lisada muude toiteelementide kõrval ka süsivesikuid. Süsivesikud on *in vitro* taimedele peamiseks energiaallikaks.

Mitmed teadlased on uurinud erinevate süsivesikute sobivust eri taimeliikide koekultuurimeetodil paljundamiseks. Üks esimesi sellealaseid töid tehti porgandi kudedega (Gautheret, 1945). Leiti, et sobivaimaks süsiniku allikaks toitesegus oli sahharoos, sellele järgnesid glükoos, maltoos ja laktoos. Kõige vähemefektiivne oli fruktoos. Tänapäeval kasutatakse koekultuuride meetodites, ja seega ka erinevate kultuuride mikropaljunduses, söötmesse lisatava süsivesikuna tavaliselt sahharoosi. Sahharoosi esinemine söötmes aga pidurdab klorofüllü moodustumist ja fotosünteesi, muutes taimealgete autotroofse kasvu veel komplitseeritumaks, kui see katseklaasitingimuses juba niigi on (George, 1993).

Glükoos mõjutab taimealgete kasvu *in vitro* tavaliselt sama efektiivselt ning mõnede kultuuride puhul on isegi sobivam kui sahharoos, kutsudes esile aktiivsemat kasvu või soodustades organogeneesi ka juhul, kui sahharoos selleks ei sobi (Ferguson, 1967; Bhojwani, Razdan, 1983; Phillips, Hubstenberger, 1985).

Käesoleva uurimuse eesmärgiks oli välja selgitada glükoosi sobivus maguskirsi mikropaljunduseks *in vitro* ning selle optimaalne kontsentratsioon söötmes.

Materjal ja meetodika

Katsed korraldati Eesti Põllumajandusülikooli Taimebiotehnoloogia Uurimiskeskuses EVIKA ajavahemikul november-detsember 1998. Taimmaterjalina kasutati teaduskeskuse EVIKA *in vitro* geenipangas säilitatud maguskirsi 'Tõmmu' võrsepuhmaid, mida oli säilitusperioodi järgselt värsketele söötmele üle kantud kolmenädalaste intervallidega. Sordi 'Tõmmu' valikul katsetesse arvestati, et see sort on Eestimaise päritoluga (aretatud Polli Aiandusinstituudis 1965. aastal (Jaama, Jaama, 1992)), seetõttu talvekindel ja sobiv meie kliimas kasvatamiseks ning Eesti aednike hulgas küllaltki populaarne.

Uurimise alla võeti glükoosi kui võimaliku mikrotaimede energiaallika erinevad kogused mureli paljundussöötmes, mida võrreldi sahharoosiga. Puhta laboratoorse sahharoosi asemel kasutati tavalist toidusuhkrut, mis on teaduskeskuse EVIKA praktikas rakendatava mikropaljunduse tarvis piisava puhtusastmega. Kontrollvariandis lisati Murashige-Skoogi (MS) söötmele (Murashige, Skoog, 1962) suhkrut 30 g/l. Glükoosivariandid sisaldasid monosahhariidi 10, 20, 30, 40 ja 50 g/l.

Hoogsalt paljunevatest võrsepuhmaketest eraldati ükshaaval hästiarenenud lehtedega võrsed ning istutati need 250 ml purkidesse, igasse purki 5 võrset. Igas variandis oli neli kordust. Purgid katsematerjaliga asetati kontrollitavate niiskus-, temperatuuri- ja valgustingimustega fütotroni, kus kehtis 16-tunnine päevapikkus ning temperatuur vahemikus +22...+24 °C. Kolme nädala möödumisel kanti paljunevad võrsepuhmad üle värsketele söötmele, mille koostis vastas katsevariantidele. 6 nädalat pärast katse algust loeti igas võrsepuhmas arenenud pea- ja kõrvalvõrsete arv ning mõõdeti võrsete pikkused.

Tulemused

Katsetest selgus, et glükoos mõjutab maguskirsi mikrovrsete paljunemist sama efektiivselt kui sahharoos. Erinevused paljunemiskoeffitsiendis ilmnesisid madalamate glükoosikoguste – 10...30 g/l – korral, mil proliferatsioon ehk kõrvalvõrsete moodustumise intensiivsus jäi madalamaks kui sahharoosi 30 g/l lisamisel söötmesse. Kõrgema glükoosi kontsentratsiooni korral – 40 ja 50 g/l – ületas tekkinud kõrvalvõrsete arv mõnevõrra sahharoosi variandis loendatud võrsete arvu (tabel 1).

Tabel 1. Glükoosi mõju maguskirsi adventiivvõrsete tekkele *in vitro* (võrseid tk.)

Table 1. Influence of glucose on the formation of sweet cherry adventitious shoots *in vitro*

Kontroll Control	Glükoos 10 g/l Glucose 10 g/l	Glükoos 20 g/l Glucose 20 g/l	Glükoos 30 g/l Glucose 30 g/l	Glükoos 40 g/l Glucose 40 g/l	Glükoos 50 g/l Glucose 50 g/l
8,5	3,75	7,3	6,6	10,1	9,85

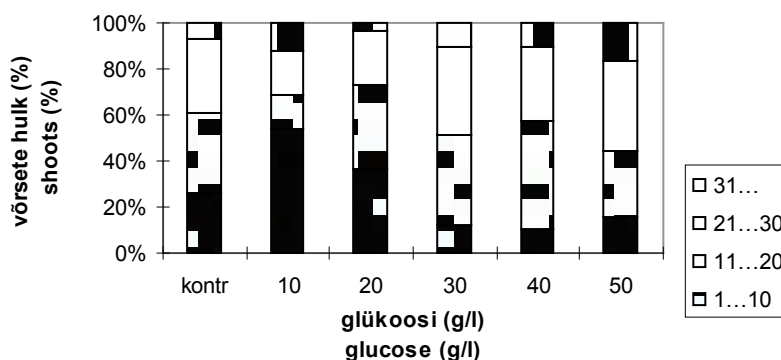
Mikrovõrsete pikkuskasvus oli märgatav glükoosi positiivne mõju. Kui 10 ja 20 g/l glükoosi sisaldavatel söötmetel jäid mikrovõrсед veidi lühemaks kontrollvariandil kasvanutest, siis 30...50 g/l korral võrsete pikkuskasv ületas seda näitajat ($p_{0,05}=4,032421$) (tabel 2).

Tabel 2. Glükoosi mõju maguskirsi mikrovõrsete pikkuskasvule (mm) *in vitro*

Table 2. Influence of glucose on the elongation of sweet cherry shoots *in vitro* (mm)

Kontroll Control	Glükoos 10 g/l Glucose 10 g/l	Glükoos 20 g/l Glucose 20 g/l	Glükoos 30 g/l Glucose 30 g/l	Glükoos 40 g/l Glucose 40 g/l	Glükoos 50 g/l Glucose 50 g/l
18,6	16,6	15,9	20,4	19,7	21,6

Glükoosi kogusel 10 g/l loeti proportsionaalselt kõige rohkem mikrovõrseid pikkusvahemikus 0...10 mm, samal ajal kui kontsentratsioonidel 30...50 g/l oli enamik võrseid pikkuses 11...20 ja 21...30 mm (joonis 1).



Joonis 1. Maguskirsi võrsete hulk erinevates pikkusvahemikes

Figure 1. Percentage of shoots on different length levels

Erinevus kontrollvariandist ilmnis nende variantide puhul suhteliselt väikeses lühimate võrsete hulgas: kontrollvariandis oli võrseid pikkusega 0...10 mm üle 20%, glükoosi korral 30 ja 40 g/l aga alla 10%. 50 g/l variandis oli lühikesi võrseid pisut enam, seda ilmselt suure süsivesikukoguse poolt põhjustatud intensiivsema uute võrsete moodustumise tõttu.

Vaatluste käigus täheldasime, et glükoosi variantides kasvanud mikrovõrсед olid rohtsemad ja hapramad kui sahharoosiga söötmetel.

Arutelu

Toitesegus sisalduv sahharoos hüdrolyüsitakse tavaliselt kas osaliselt või tervenisti monosahhariidideks – glükoosiks ja fruktoosiks. Osa sahharoosi hüdrolyüsist toimub juba söötme autoklaavimisel (Ball, 1953; Wolter, Skoog, 1966). Umbes 10–15% sahharoosist laguneb glükoosiks ja fruktoosiks. Seetõttu on loogiline võrrelda nende kahe suhkru efektiivsust taimede mikropaljundusele sahharoosiga. *Canna indica* meristeemide kultuuristamine osutus näiteks glükoosi 25 g/l ja fruktoosi 5 g/l sisaldanud söötmetel edukamaks kui ainult 30 g/l sahharoosiga söötmetel (Kromer, Kukulczanka, 1985). Antud katsetes kasutasime ainult glükoosi, mistõttu monosahhariidi positiivne efekt maguskirsi paljunemisele ei olnud nii ilmne.

Morfogeneesi või kasvu normaalseks kulgemiseks *in vitro* vajavad erinevad taimeliigid väga erinevat süsivesikute kontsentratsiooni. Katsetes *Prunus mume*'ga leidsid H. Harada ja Y. Murai (Harada, Murai, 1996), et mikrovõrsete proliferatsioon oli glükoosi sisaldanud söötmetel märgatavalt edukam kui sorbitooli, fruktoosi ja sahharoosiga söötmetel. Sahharoos põhjustas lehekloroosi ja võrсед hävisid järk-järgult. G. Marino jt. (Marino *et al.* 1991, 1993) näitasid, et *Prunus* sp. adventiivvõrsete teke oli sorbitooli mõjul intensiivsem kui sahharoosi

mõjul. Hapukirsi paljunemist mõjutavad võrdselt edukalt nii sahharoos kui glükoos (Borkowska, Szczerba, 1991).

Kui võrrelda omavahel võrsete kasvu 30 g/l glükoosiga ja 30 g/l sahharoosiga söötmele meie katsetes, jäi paljunemiskoeffitsient glükoosi sisaldanud söötmes mõnevõrra alla sahharoosiga söötmele, samas olid arenenud võrsed glükoosisegul mõnevõrra pikemad. 40 g/l glükoosi soodustas võrsete paljunemist ja pikkuskasvu nii, et mõlemad parameetrid ületasid kontrollvariandi tulemusi. Mikrovrsete hulk pikkusvahemikes 11...20 ja 21...30 mm oli glükoosi 40 g/l korral märgatavalt suurem kui kontrollvariandis. Nii võib öelda, et glükoos sobib maguskirsi mikrovrsete pikkuskasvu stimuleerimiseks.

Paljunemisaasi kasvutingimused mõjutavad hiljem ka mikrovrsete juurdumist ning aklimatiseerumist. Õunapuu paljundamisel erineva sahharoosi kogusega söötmetel avastati, et sahharoosi kontsentratsiooni tõstmine 35 grammi liitri kohta intensiivistas paljunemist, juurdumist ja ellujäämist aklimatiseerumisel (Kunneman, Albers, 1992). Suhkrud mõjutavad koekultuuri viidud taimedes ksüleemi ja floeemi kudede diferentseerumist. T. Shininger (1979) on järeldanud, et ainult need süsivesikud, mis mõjutavad positiivselt rakkude jagunemist, soodustavad trahheede moodustumist taimedes. Mägivahttra suspensioonkultuuris moodustasid rakud suuri ligniinikoguseid, kui neid kasvatati väga kõrge sahharoosi (üle 6%) kontsentratsiooniga söötmele (Carceller *et al.*, 1971).

Antud katses märkasime, et glükoosil kasvanud mikrovrsete olid rohtsemad ja hapramad kui sahharoosil kasvanud võrsed. Ilmselt on sahharoosi mõju kudede puitumisele suurem kui glükoosi mõju. *In vitro* juurdunud mikrotaimed peaksid enne katseklaasist väljaistutamist piisavalt puituma, et nende vastuvõtlikkus kasvuhoones esinevale madalamale õhuniiskusele oleks võimalikult väike ning seeläbi paraneks taimede aklimatiseerumisvõime. Seetõttu ei saa glükoosi soovitada viimaseks maguskirsi paljundusülekaneks enne juurdumissöötmele istutamist.

Järeldused

Sahharoos on kõige levinum süsivesik, mida sobib kasutada pea kõigi kultuuride mikropaljunduses. Glükoos mõjutab taimealgete kasvu sama hästi, mõnede taimeliikide puhul on täheldatud isegi suuremat efektiivsust. Antud katses ei täheldatud maguskirsi sordi 'Tõmmu' puhul kõrgemate glükoosikontsentratsioonide ja sahharoosi vahel mikrovrsete paljunemises olulisi erinevusi. Kui soovitakse kiiresti mõne paljundusülekanega stimuleerida võrsete pikkuskasvu, võiks toitesegus kasutada glükoosi kontsentratsioonis 30–40 g/l. Arvesse tuleb võtta ka glükoosi suhteliselt kallimat turuhinda, mis teeb selle kasutamise söötmesse lisatava süsivesikuna ebaökonomiseks.

Kirjandus

- Ball E. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media, a neglected aspect in the culture of plant tissues. *Bull. Torrey Bot. Club*, 80, p. 409–411, 1953.
- Bergmann L. Wachstum grüner Suspensionkulturen von *Nicotiana tabacum* Var. 'Samsun' mit CO₂ als Kohlenstoffquelle. *Plant* 74, p. 243–249, 1967.
- Bhojwani S. S., Razdan M. K. *Plant tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1983.
- Borkowska B., Szczerba J. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. – *J. Exp. Bot.*, 42, p. 911–915, 1991.
- Carceller M., Davey M. R., Fowler M. W., Street H. E. The influence of sucrose, 2,4-D and kinetin on the growth, fine structure and lignin content of cultured sycamore cells. *Protoplasma*, 73, p. 367–385, 1971.
- Ferguson J. D. The nutrition of excised wheat roots. *Physiol. Plant.*, 20, p. 276–284, 1967.
- Gautheret R. J. Une voie nouvelle en biologie végétale: la culture des tissus. Gallimard, Paris, 1945.
- George E. F. *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1. The technology*. Exegetics Limited, 574 p., 1993.
- Harada H., Murai Y. Micropropagation of *Prunus mume*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46, p. 265–267, 1996.
- Jaama A., Jaama E. *Kirsid*. Tln, Valgus, 176 lk., 1992.
- Kromer K., Kukulczanka K. *In vitro* cultures of meristem tips of *Canna indica* L. *Acta Hort.*, 167, p. 279–285, 1985.
- Kunneman B. P. A. M., Albers M. R. J. Effects of tissue culture and acclimatization conditions on the survival and growth of rooted and unrooted *Malus* and *Pyrus* microcuttings. *Acta Hort.*, 314, p. 147–154, 1992.
- Larosa P. C., Hasegawa P. M., Bressan R. A. Initiation of photoautotrophic potato cells. *HortScience*, 16, 1981. – 433 (Abst. 249).
- Marino G., Bertazza G., Magnanini E., Altan A. G. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 34, p. 235–244, 1993.

- Marino G., Magnanini E., Battistini S., Righetti B. Effect of hormones and main carbon energy sources on *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cvs. 'San Castrese' and 'Portici'. *Acta Hort.*, 293, p. 355–362, 1991.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, p. 473–497, 1962.
- Phillips G. C., Hubstenberger J. F. Organogenesis of pepper tissue cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 4, p. 261–269, 1985.
- Shininger T. I. The control of vascular development. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30, p. 313–337, 1979.
- Wolter K. E., Skoog F. Nutritional requirements of *Fraxinus* callus cultures. *Am. J. Bot.*, 53, p. 263–269, 1966.

Utilization of Different Carbohydrates in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Micropropagation

V. Vasar

Summary

Prunus avium L. cultivar 'Tömmu' was *in vitro* preserved and micropropagated on Murashige-Skoog medium. The effect of carbohydrate source was examined, sucrose 30 g/l was compared to glucose 10, 20, 30, 40 and 50 g/l concentrations. Glucose 40 and 50 g/l provided better shoot proliferation than sucrose 30 g/l. Glucose-containing media of 30-50 g/l were superior to sucrose-containing medium in shoot elongation. Percentage of shoots on different length levels was also affected by carbohydrates. At glucose concentration 10 g/l, most of the shoots were shorter than 10 mm while at 30, 40 and 50 g/l glucose about 80% of shoots were in the length of 11...30 mm. In sucrose treatment the number of shoots less than 10 mm long was relatively higher than on glucose 30 g/l. The glucose-treated plantlets were more fragile and less lignified than sucrose-treated ones. As lignification is very important in microplants' acclimatization in greenhouse, glucose is not recommended for the last multiplication subculture before rooting phase.