

ÕUNAPUU POOLNÕRGAKASVULISE POOKEALUSE M26 MIKROVÕRSETE PALJUNEMINE JA PIKKUSKASV *IN VITRO* SÕLTUVALT KUNSTLIKUST SÖÖTMEST

V. Vasar, T. Kokk

Sissejuhatus

Õunapuu saagikust, võra suurust ja kuju mõjutab oluliselt pookealus. Viimastel aastatel on eesti aednikud ilmutanud huvi nn kääbusaluste vastu. Sellesse rühma kuuluvad ülinõrga- (M27), nõrga- (M9, B9, M26) ja poolnõrgakasvulised (M4) alused. Sageli võib nende tavameetoditel paljundamine osutuda küllaltki keerukaks. Kääbusalused on aeglase kasvuga ning suure hulga istikute tootmiseks kulub palju aega ja raha. *In vitro* meetodid pakuvad kiiremat võimalust kloonide paljundamiseks. Et viimase kümne-viieteistkümnepäevase aasta jooksul on levima hakanud viljapuid kahjustavad viirushaigused, on meristeemmeetodil paljundatud viirusvabade viljapuude populaarsus veelgi kasvanud (Dodds, 1983).

Kultuuride kasvatamisel *in vitro* etendab söötme koostis ja komponentide kontsentratsioon selles olulist osa, mõjutades adventiivvõrsete teket, pikenemist, puitumist ja harunemist. Sööttest sõltub suuresti ka füsioloogilise häire, klaasistumise esinemine.

EPMÜ Taimebiotehnoloogia Uurimiskeskuses EVIKA on kasutusel mitmeid erinevaid söötmeid. Antud katse eesmärgiks oli välja selgitada, milline neist on sobivaim kääbusaluse M26 võrsete paljunemiseks ja pikkuskasvuks. Keskenduti makroelementide mõju uurimisele.

Materjal ja meetodika

Katse viidi läbi EPMÜ Taimebiotehnoloogia Uurimiskeskuses EVIKA. Lähtematerjalina kasutati 1998. a alguses *in vitro* geenipanka võetud õunapuu pookealust M26 (*Malus pumila* Mill.). Enne katse alustamist kasvas materjal Murashige-Skoogi toitesegul (MS) (Murashige, Skoog, 1962), millele oli lisatud 4,44 µM/l 6-bensüülaminopüriini (BA) ja 0,49 µM/l indolüülvõihapet (IBA).

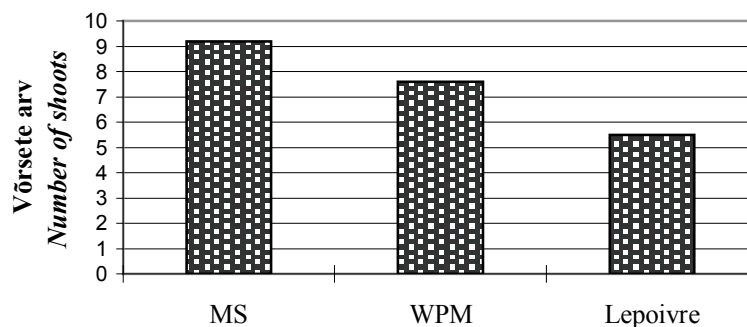
Katses võrreldi samade lisanditega MS-toitesegu Lepoivre (Quoirin *et al.*, 1977) ja WPM (Lloyd, McCown, 1981) söötmetega (tabel 1). Toitesegudele Lepoivre ja WPM lisati kummalegi 4,44 µM/l BA-d. Sobiva pH-taseme (5,6) saavutamiseks kasutati NaOH 0,1M lahust.

Lopsakad ja normaalselt arenenud pookealuse M26 võrsed poolitati, kasvama asetati nii tipud kui kodarikud. Anumatena kasutati 250 ml purgikesi, igasse purki istutati 4 eksplantaati. Kogu katseperioodi jooksul hoiti kultuure temperatuuril +23...+25 °C päeva pikkusel 16 h.

Iga 7 päeva järel mõõdeti kasvavate mikrovrsete pikkus. Kolme nädala möödumisel kanti eksplantaadid üle sama koostisega värskele segule, vältimaks toitainete puudumisel taime organismis tekkivaid häireid. Katse lõpetamisel loendati arenenud võrsed ja määrati klaasistunud puhmaste osatähtsus.

Tabel 1. Makroelementide sisaldused MS, WPM ja Lepoivre toitesegudes (mg/l)
Table 1. Macronutrient compositions in MS, WPM and Lepoivre mediums (mg/l)

Makroelemendid <i>Macronutrients</i>	MS	WPM	Lepoivre
KNO ₃	1900		1800
NH ₄ NO ₃	1650	400	1800
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O		556	1200
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	96	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	370	360
KH ₂ PO ₄	170	170	280
K ₂ SO ₄		990	



Joonis 1. Erinevate toitesegude mõju õunapuu pookealuse M26 mikrovõrsete arvule puhmas
Figure 1. Effect of different mediums on number of shoots per clump of apple rootstock M26

Tulemused

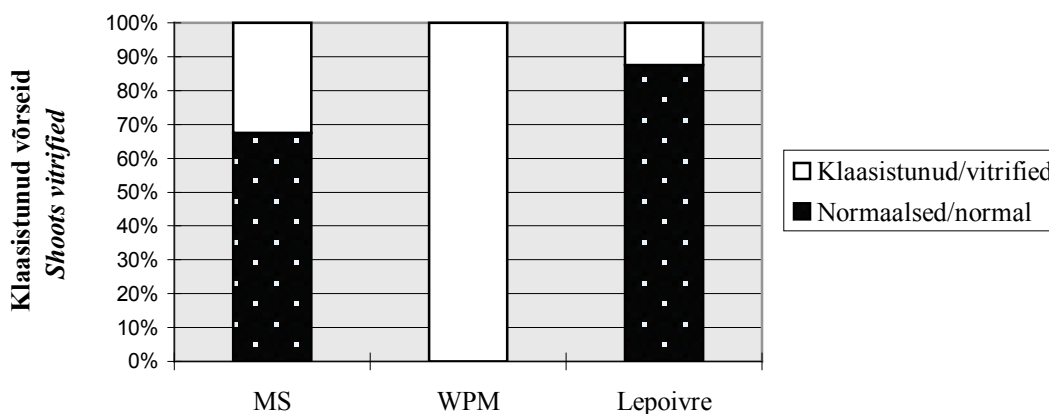
Viimast korda mõõdeti võrseid 6 nädalat pärast katse alustamist. Selleks ajaks oli kõigil kolmel söötmel kasvanud taimedel arenenud vähemalt 5 kõrvalvõrset (joonis 1), mille keskmine pikkus ületas kõikides katsevariantides 14 mm.

MS-söötmel kasvanud võrsed olid pisut pikemad kui teised, ka oli neid moodustunud mõnevõrra rohkem. Klaasistunud oli 32,5% puhmakestest (joonis 2). Lepoivre-söötmel oli arenenud võrsete hulk väikseim, kuid selles katsevariandis esines kõige vähem taimede klaasistumist (12,5%). WPM-söötmel kasvanud eksplantaadid jäid teistest märgatavalt lühemaks ning olid eranditult klaasjad.

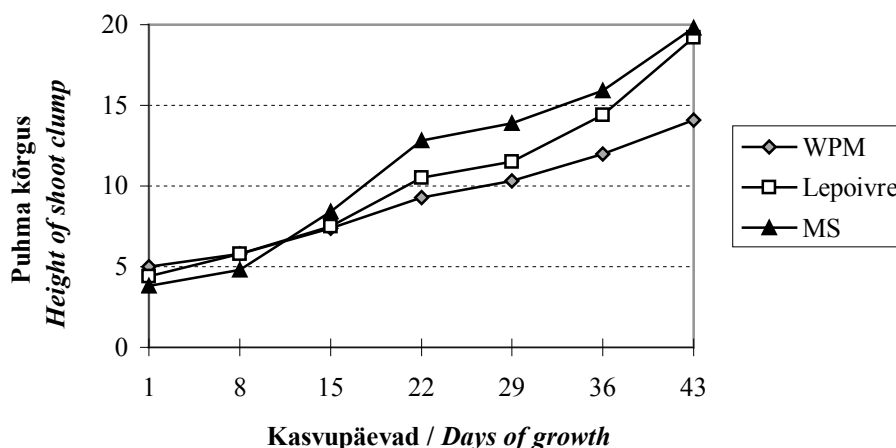
Pärast ülekannet (22. kasvupäeval) aeglustus kõikides variantides ajutiselt taimede kasv.

Arutelu

Taime pikkuskasvu ja paljunemist *in vitro* mõjutab suurel määral toitesegu üldlämmastikuisaldus. Mitmete liikidele võib see MS-söötmes olla liiga kõrge (60 mM) (George, 1993). Katses selgus, et õunapuualus M26 areneb siiski kõige paremini MS-söötmel. Lepoivre- ja WPM-söötmete lämmastikuisaldus (vastavalt 27,5 ja 16,6 mM) jääb sellele kultuurile väikeseks. Maguskirsiga tehtud katsetes on võrreldud täiskontsentratsiooniga MS-söödet sama toiteseguga, kus lämmastikuisaldust oli vähendatud poole võrra. Rammusamal söötmel kasvasid mikrovõrsed pikemaks, kuid võrsete arv ei olnud usutavalt erinev (Vasar, 1998).



Joonis 2. Erinevate toitesegude mõju M26 mikrovõrsete klaasistumisele
Figure 2. Effect of different mediums on vitrification of microshoots



Joonis 3. Õunapuu pookealuse M26 mikrovõrsete keskmine pikkus kasvuperioodil erinevatel toitesegudel (mm)
Figure 3. The average height of apple rootstock M26 shoots on different mediums during the growing period (mm)

Oluline on jälgida ka $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ionide vahekorda. Liiga kõrge ammoniumioonide sisaldus võib olla üheks klaasistumist tekitavaks faktoriks (George, 1993). Klaasistumine on *in vitro* kasvavatel kultuuridel sagedasti esinev füsioloogiline häire. Klaasistunud taimed on kergesti eristatavad läbipaistva välimuse ja moonduvad lehtede ning võrsete tõttu. Selliste taimede kudedesse on akumulunud vesi, klorofüll- ja ligniinisaldus on vähenenud (Phan, Letouzé, 1983; Kevers *et al.*, 1984; Phan, Hegedus, 1986). MS-söötmele on $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ vahekord vaid 1,9 (Lepoivrele 4,7 ja WPM-l 2,4). Võrreldes katsetulemuse, võib väita, et M26-le sobiks paremini $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ionide suurem vahekord, kui see on MS-l, kusjuures üldlämmastiksisaldus võiks jääda samaks.

WPM-toitesegus on M26 mikrovõrsete arenguks liiga vähe kaaliumi (6,9 mM), mis samuti põhjustab taimede klaasistumist (Pasqualetto *et al.*, 1988). MS- ja Lepoivre-söötmed sisaldavad kaaliumi tunduvalt rohkem – 20 mM.

Olulisemate makroelementide hulka kuulub ka kaltsium. Näiteks küdoonia pookealusel Quince C vähendas suurem kaltsiumikogus toitesegus tunduvalt klaasistumist, kuid samas mõjus pärssivalt taimede kasvule (Singha *et al.*, 1990). Samasugust tendentsi võis märgata ka antud katses. Kõrge kaltsiumisisaldusega toitesegul Lepoivre (7,2 mM) oli klaasistunud puhmaki kõige vähem, kuid väike oli ka arenenud võrsete hulk.

Järeldused

Kuigi katsetulemused näitavad, et kõige paremini sobib õunapuu pookealusele M26 MS-toitesegu, tuleks mõnede komponentide kontsentratsioone selles muuta. Eelkõige peaks suurendama $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ionide vahekorda ning kaltsiumisisaldust. Need võtted aitaksid tunduvalt vähendada klaasistunud võrsete hulka.

WPM-sööde on pookealuse M26 jaoks liiga madala toitesoolade kontsentratsiooniga.

Lepoivre-söötmes tuleks pisut vähendada kaltsiumisisaldust ning tõsta üldlämmastiksisaldust. Sel teel saavutatakse parem võrsumine.

Kirjandus

- Dodds J. H. Tissue Culture of Trees. – The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 1983. – 148 p.
- George E. F. Plant Propagation by Tissue Culture Part 1. The technology. – Exegetics Limited, 1993. – 574 p.
- 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, 59...66, 1984.
- Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. – *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30, p. 421...427, 1981.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. – *Physiol Plant*, vol. 15, p. 473...497, 1962.
- Pasqualetto P.-L., Zimmerman R. H., Fordham I. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. – *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.*, 14, p. 31...40, 1988.

- Phan C. T., Hegedus P. Possible metabolic basis for the developmental anomaly observed in *in vitro* culture, called "vitreous plants". – *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.*, 6, 83...94, 1986.
- Phan C. T., Letouzé R. A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnamate: CoA ligase of normal and vitreous plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*. – *Plant Sci. Lett.*, 31, 323...327, 1983.
- Quoirin M., Lepoivre P., Boxus P. Un premier bilan de dix années de recherche sur les cultures de méristemes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. *Compte rendu des recherches*. – *Stn Cult Fruit Maraich Gembloux 1976-1977*, p. 93...117.
- Singha S., Townsend E. C., Oberly G. H. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots *in vitro*. – *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.*, vol. 23, No. 2, p. 135...142, 1990.
- Vasar V. Lämmastiku ja tsütokiniinide mõju maguskirsi (*Prunus avium* L.) paljunemisele ja pikkuskasvule *in vitro*. – *Akadeemilise Põllumajanduse Seltsi Toimetised* 6, lk. 117...120, 1998.

***In vitro* Shoot Proliferation and Elongation of Apple Dwarf Rootstock M26 Depending on Culture Medium**

V. Vasar, T. Kokk

Summary

The main idea of the experiment was to determine the best medium for proliferation and elongation of apple dwarf rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). Media already in use in the Estonian Agricultural University Plant Biotechnological Research Centre EVIKA were compared: MS medium supplemented with 4.44 µM/l BA and 0.49 µM/l IBA; WPM and Lepoivre mediums both supplemented with 4.44 µM/l BA. Shoots grown on MS medium proliferated and elongated best. More vitrified shoots were observed on MS medium than on Lepoivre medium, but very few new shoots had proliferated on the second one. WPM medium was unsuitable for M26 microcuttings - they were all vitrified.