

HAPU- JA MAGUSKIRSI JUURDUMINE *IN VITRO* JA *EX VITRO* NING AKLIMATISEERUMINE KASVUHOONES

V. Vasar

Sissejuhatus

Taimede käitumine katseklaasitingimustes sõltub eeskätt nende genotüübist. Mikropaljunduse protsessis võib eristada 4 kasvufaasi – eksplantaadi algareng, paljunemine (ja pikenemine), juurdumine ning aklimatiseerumine (George, 1993). Kaks viimast faasi on mikropaljunduse edukusele kõige määravama tähtsusega.

Juurte moodustumine sõltub nii juurdumiskeskonna füüsikalistest tingimustest (Nemeth, 1986) kui ka sordist ning mikrovrõrsete omadustest (George, 1993). Juurdunud mikrovrõrsete ellujäämiseks kasvahoones peab juurestik olema võimeline varustama mikrovrõrseid toitainete ja veega sel ajal, kui taimedel arenevad uued võrsed ja lehed (Nemeth, 1986). Juurdumine võib toimuda *in vitro*, s.t. et mikrovrõrsed kantakse paljunemissöötmele üle auksiini sisaldavale juurdumissöötmele. Teise võimalusena võib mikrovrõrsed pärast lühiajalist auksiinidega töötlemist koheselt istutada mittesteriilsele kasvusubstraadile, kus katseklaasi väliselt toimub juurte areng ning samaaegselt ka järkjärguline aklimatiseerumine.

Aklimatiseerumine on kõikide mikropaljunduse skeemide kohaselt protsessi viimane etapp. Selle vältel peavad taimed kohanema uute keskkonnatingimustega, nagu madalam õhuniiskus, suurem valguse intensiivsus, temperatuuride kõikumine ja pidev vastupanu haigustele (Preece, Sutter, 1991). On ilmne, et viimase kasvatapina mõjutab aklimatiseerumine taimede masspaljundust oluliselt. Üldiselt on paljude puittaimede aklimatiseerumine komplitseeritum kui rohhtaimede aklimatiseerumine. Mõnikord hävib 50 kuni 100% väljaistutatud taimedest (Kunneman, Albers, 1992). Paljude liikide korral saab aklimatiseerumisprobleeme ületada kohese *ex vitro* juurutamisega, teiste puhul annab see vähe tulemusi. Seetõttu on oluline lähemalt uurida *in vitro* moodustunud juurestiku efektiivsust taimede varustamisel toitainete ja veega.

Käesoleva uurimuse eesmärgiks oli võrrelda kahe luuviljalise viljapuu liigi – maguskirsi (*Prunus avium* L.) ja hapukirsi (*Prunus cerasus* L.) mikrovrõrsete *in vitro* ja *ex vitro* juurdumist ning aklimatiseerumist sõltuvalt auksiinidega töötlemisest.

Materjal ja meetodika

Proliferatsioonifaas. Taimmaterjalina kasutati Teaduskeskus EVIKA *in vitro* geenipangas säilitatud hapu- ja maguskirsipuu aktiivselt paljunevaid võrsepuhmaid, mis kasvasid 16-tunnise päevapikkuse juures temperatuuril +22...+24 °C modifitseeritud Murashige-Skoogi (MS) söötmele (Murashige, Skoog, 1962), millesse oli lisatud 1 mg/l BA, 30 g/l suhkrut ning 7 g/l agarit. Katsetes kasutati hapukirsi sorte 'Läti madalkirss' ja 'Hindenburg' ning maguskirsi sorte 'Tõmmu', 'Meelika', 'Rubiin' ja 'Kristiina'.

Juurdumine *in vitro*. Hapukirsi sortide hoogsalt paljunevatest võrsepuhmakestest eraldati ükshaaval hästiarenenud lehtedega võrsed ning istutati need juurdumissöötmele (1/2 MS), millesse lisati juurdumist soodustavat auksiini indolüülvõihapet (IBA) kas 0, 1, 3 või 8 mg/l. Igas katsevariandis oli 50 mikrovrõrset.

Katsetes maguskirsiga võrreldi kahe erineva auksiini – indolüülvõihappe (IBA) ja naftüül-äädikhappe (NAA) – mõju mikrovrõrsete juurdumisele. Katsetati 4 erinevat auksiinide kontsentratsiooni: 1,5; 3; 4,5 ning 6 mg/l. 4 nädalat pärast katse algust loendati juurdunud võrsed, samuti loeti iga võrse alusel tekkinud juurte arv ning mõõdeti juurte pikkus. *In vitro* juurdunud taimed istutati plastikrullidesse, kaeti niiskustaseme hoidmiseks kilega ning jälgiti taimede kohanemist kasvahoone tingimustega.

Juurdumine mittesteriilsetes tingimustes. Hapukirsi 20–35 mm pikkused võrsed (100 mikrovrõrset variandi kohta) eraldati puhmast ning töödeldi IBA lahusega enne kilerulli istutamist, et soodustada juurte arenemist mikrovrõrsetel. Katsetati kolme erinevat IBAga eeltöötlemise viisi: mikrovrõrsed asetati võrsete alumiste otstega IBA 0,0003%-lisse lahusesse 24 või 48 tunniks, või võrsed istutati kilerulli turbasubstraati ning kasteti koheselt IBA 0,0003%-lise lahusega. 120 võrset juurutati *in vitro* ½ MS-söötmele, millesse lisati 3 mg/l IBA ja istutati pärast 4-nädalast juurdumisperioodi kilerulli, et võrrelda *in vitro* ja *ex vitro* juurdunud taimede aklimatiseerumise efektiivsust.

Maguskirsi mikrovrõrsed istutati kilerulli turbasubstraati ning kasteti IBA 0,0003%-lise lahusega. Võrdluseks juurutati osa mikrovrõrseid katseklaasis ½ MS-söötmele, mis sisaldas 3 mg/l IBA ja istutati hiljem samuti kilerulli. Kilerullid kaeti kaheks esimeseks adaptatsiooninädalaks kilega. 6 nädalat pärast istutamist loeti ellujäänud edukalt juurdunud võrsed igas variandis.

Tabel 1. IBA kontsentratsiooni mõju hapukirsi juurdumisele *in vitro*
Table 1. The influence of IBA concentration on rooting of *Prunus cerasus* *in vitro*

IBA (mg/l)	Juurte arv taimel <i>No of roots per shoot</i>	Juurte pikkus (mm) <i>Root elongation (mm)</i>	Juurdunud taimi (%) <i>Rooted shoots (%)</i>
0	0,7	7,4	8
1	2,3	23,3	60
3	3,0	22,6	74
8	3,7	13,4	50

Tulemused

Juurdumine *in vitro*. Hapukirsi mikrovrõrsetel ilmusid 1 ja 3 mg/l IBA variantides esimesed juurealged ligikaudu 10–14 päeva pärast katse algust. 8 mg/l IBAga söötmeel moodustus võrse alusele kallus ning juurealged ilmusid umbes 10 päeva hiljem kui teistes variantides. Kõrgema auksiini kontsentratsiooniga söötmetel tekkis mikrovrõrse alusel rohkem juuri (tabel 1). Kasvuregulaatori väljajätmine söötmetest ei soodustanud juurte arengut. IBA mõju juurte pikkusele mõõdeti 25ndal kasvupäeval. Väiksemate auksiini koguste korral juurte pikkuses olulisi erinevusi ei olnud. 8 mg/l IBA puhul olid juures sel ajal veel märgatavalt lühemad. Kõrgeim juurdumisprotsent määrati 3 mg/l IBA variandis.

Maguskirsi mikrovrõrsetel reageerisid söötmesse lisatud auksiinidele märgatava erinevusega. Üldiselt mõjutas IBA mikrovrõrsete juurdumist oluliselt efektiivsemalt kui NAA. Esimesed juurealged ilmusid 7–10 päeva jooksul. NAA-d sisaldanud söötmetel arenesid juured veidi aeglasemalt kui IBAga söötmeil. 4 nädala möödumisel olid erinevused variantide vahel märgatavad. Ehkki keskmine juurdumisprotsent oli IBAga söötmetel vaid veidi kõrgem kui NAAga söötmetel (tabel 2), oli juurte arv mikrovrõrsete kohta IBA puhul oluliselt suurem kui NAA korral. Söötmetel, mis sisaldasid IBA-d, arenesid elujõulised, ühtlase pikkusega juured, samal ajal kui NAAga söötmete arenesid mikrovrõrsete alusel üksikud peened, haprad juured.

Juurdumine mittesteriilsetes tingimustes. Hapukirsi mikrovrõrsete 3 nädalat kestnud *in vitro* juurdumise järel oli kuni 99,2% 'Läti madalkirsi' võrsetest edukalt juurdunud (tabel 3). Ehkki *ex vitro* juurdunud taimedel formeerusid juured algul mõnevõrra aeglasemalt (76,2...94,5%), näitas lõplik katseandmete kogumine pärast 6 nädalat kestnud kasvuhooneperioodi, et üldine ellujäämisprotsent oli mittesteriilsetes tingimustes juurdunud taimede puhul kõrgem kui katseklaasis juurdunud taimedel. Aklimatiseerunud taimi loendati kõige rohkem variandis, kus mikrovrõrseid oli istutusjärgselt kastetud 0,0003%-lise IBA lahusega.

Maguskirsi mikrovrõrsete ellujäämisprotsent jäi üldiselt madalamaks kui sama näitaja hapukirssidel. *In vitro* juurdumine üldiselt tõstis mõnedel sortidel aklimatiseerunud taimede arvu (joonis 1). Suurim juurdunud taimede arv *in vitro* täheldati sordil 'Tõmmu'. Ka kasvuhooneitingimustega kohanesid kõige edukamalt 'Tõmmu' mikrovrõrsetel. Sortide 'Meelika' ja 'Kristiina' ellujäämisprotsent oli kõige madalam.

Arutelu

Auksiinidega töötlemine on viljapuude mikrovrõrsete juurdumisel olulise tähtsusega. Juurte diferentseerumist stimuleerib otseselt mõju, mida auksiinid avaldavad kudede mikrovrõrsete alumises osas. Juurte moodustumist võib mõjutada mitmel viisil, kõige sagedamini kasutatav moodus on auksiinide lisamine juurdumissöötmesse. IBA on hapukirsi mikropaljunduses kõige sagedamini kasutatav auksiin (Marin, Gella, 1991). Mitmete teadlaste poolt saavutatud tulemused erinevate auksiinikontsentratsioonidega töötlemisel on suuremal või vähemal määral vasturääkivad. Meie saavutasime hapukirsiga parimaid tulemusi, lisades söötmesse 3 mg/l IBA-d, kuid kõrgemad kontsentratsioonid mõjusid juurdumist pidurdavalt.

Mõnedel andmetel on NAA andnud maguskirsi juurdumisel paremaid tulemusi kui IBA (Snir, 1982), samas on teised autorid saavutanud optimaalse juurdumise, kasutades söötmes IBA-d (Jones, Hoppood, 1979; Pevalek-Kozlina, Jelaska, 1987; Hammatt, Grant, 1997). Meie tulemused näitavad selgesti, et IBA on Eesti päritoluga maguskirsi sortide juurdumiseks *in vitro* sobivam kui NAA.

Tabel 2. Erinevate auksiinide mõju maguskirsi mikrovrõrsete juurdumisele *in vitro*
Table 2. The influence of auxin treatment on rooting of *Prunus avum* microshoots *in vitro*

Auksiini kontsentratsioon (mg/l) <i>Auxin concentration (mg/l)</i>	Juurdunud mikrovrõrseid (%) <i>Rooted shoots (%)</i>		Juurte arv mikrovrõrsel <i>No of roots per shoot</i>	
	IBA	NAA	IBA	NAA
1,5	62,5	41,7	5,0	3,0
3	58,3	58,3	9,9	3,2
4,5	45,8	33,3	11,3	1,0
6	62,5	54,2	10,1	2,5
keskmine / <i>mean</i>	57,3	46,9	9,1	2,4

Tabel 3. Hapukirsi sortide 'Läti madalkirss' ja 'Hindenburg' juurdumine ja aklimatiseerumine erinevate IBAGA eeltöötlemisviiside puhul (andmed esitatud %na)

Table 3. Rooting and survival percentage of *Prunus cerasus* cvs 'Läti madalkirss' and 'Hindenburg' as influenced by IBA pretreatment (data given in %)

Variant Treatment	3 nädalat 3 weeks		6 nädalat 6 weeks	
	Läti madalkirss	Hindenburg	Läti madalkirss	Hindenburg
<i>in vitro</i>	99,2	71,2	70,8	62,7
IBA 48 h	77,9	85,9	76,9	88,2
IBA 24 h	94,5	76,2	84,4	90,1
IBAGA kastetud <i>watering with IBA</i>	90,5	80,5	98,1	90,3

Mitmete hapukirsi sortide juurdumiseks on edukalt kasutatud lühiajalist auksiini šokki pikaajalise *in vitro* juurdumise asemel. Häid tulemusi on saadud mikrovrsete alumise osa lühiajalisel hoidmisel kontsenteeritud auksiinilahuses: 18 tundi 50 mg/l IBA lahuses (Popov *et al.*, 1979) või 3 sekundit 200 mg/l IBA lahuses (Gebhardt, 1985).

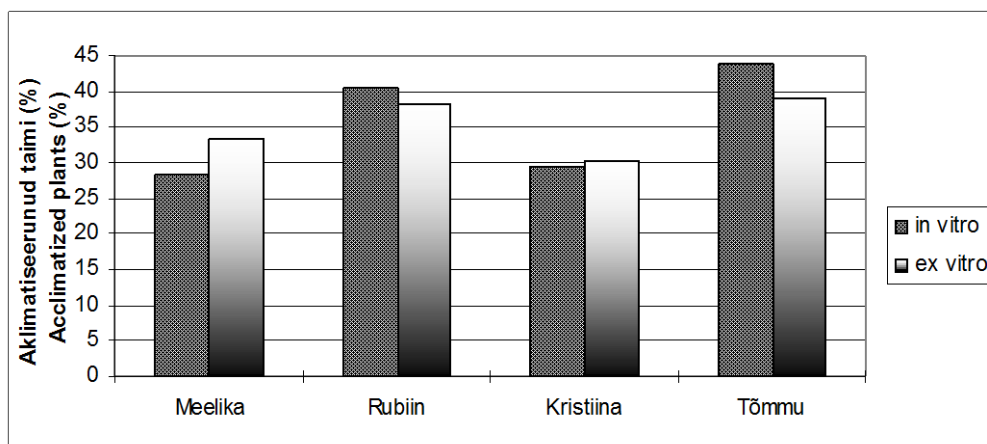
Meie kasutasime madalamat IBA kontsentratsiooni, kuid pikemat töötlemisaega, millele järgnes kohene istutamine mittesteriilsesse substraati. Selline töötlemisviis oli piisav vrsete normaalseks juurdumiseks ja edukaks adapteerumiseks kasvuhoones. Fakt, et lihtne IBA lahusega kastmine andis parimaid tulemusi, võimaldab meil järeldada, et välispidine auksiinidega töötlemine andis hapukirsi mikrovrsetele piisava impulsi ning pole mingit vajadust kasutada *in vitro* juurdumise faasi selle viljapuuliigi mikropaljunduses.

Maguskirsi mikrovrsetel erinevad oma *in vitro* käitumiselt suuresti hapukirsist. Ehkki on andmeid suhteliselt edukast maguskirsi juurdumisest mittesteriilsetes tingimustes (Pevalek-Kozlina, Jelaska, 1987), näitavad meie katsetulemused, et *ex vitro* juurdumisega ei ole võimalik tõsta maguskirsi aklimatiseerumist kasvuhoones.

Maguskirsi mikrovrsetel on hapukirsiga võrreldes suurem lehestik, mistõttu on nad vastuvõtlikumad kasvuhoone ebastabiilsetele kliimatingimustele (madalam õhuniiskus, muutuv temperatuur, suurem valguse intensiivsus) ning närtsivad kiiremini. Märkasime, et hapukirsi mikrovrsetel olid juurdumisperioodi algul puitunud kui maguskirsi vrsetel. Tõenäoliselt on mikropaljundatud maguskirsi vrsetel võimelised juurduma ning edukalt kohanema kasvuhoonetitingimustega, kui nad väljaistutuseelselt teevad läbi puitumisetapi katseklaasis.

Järeldused

IBA on üks kõige levinumaid auksiine viljapuude mikropaljunduses. 3 mg/l IBA on optimaalne kontsentratsioon hapukirsi juurdumiseks ning garanteerib kvaliteetse juurdumise ning taimede arengu. Suured IBA kogused võivad põhjustada kalluse formeerumist ja aeglustada juurte arenemist. IBA lisamisel söötmesse liiga väikestes kogustes mikrovrsetel juuri ei moodusta. Nii juurdunud kui juurdumata hapukirsi mikrovrsetel kohanevad kiiresti kasvuhoonetitingimustega, mis näitab selgesti, et välja istutamise hetkeks on nad füüsiliselt valmis kasvama autonoomselt.



Joonis 1. Maguskirsi sortide *in vitro* ja *ex vitro* juurdunud mikrovrsete aklimatiseerumine
Figure 1. Survival of *in vitro* and *ex vitro* rooted microshoots of four *Prunus avium* cultivars

Mikrovõrsete juurutamine *in vitro* on töömahukas ning kallis. Kuid sõltuvalt taime liigist ja sordist võivad juurdumata mikrovõrsed kasvuhoonesse istutamisel hukkuda, samal ajal kui juurtega mikrovõrsed kohanevad edukalt uue keskkonnaga. Meie tulemused näitavad, et maguskirss on üks neid liike, mis vajab väljaistutuseelselt *in vitro* juurutusfaasi. See tõstab taime vastupanuvõimet närtsimisele. Seega tuleb iga konkreetse liigi puhul kaaluda, kas hoida kokku kulutusi *in vitro* juurdumisele või kaotada suur hulk taimmaterjali kasvuhoones närtsimise läbi.

Kirjandus

- Gebhardt, K. Self-rooted sour cherries *in vitro*: auxin effects on rooting and isoperoxidases. *Acta Hortic.* 169: 341–349, 1985.
- George, E. F. *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology.* Exegetics Ltd, 574 p., 1993.
- Hammatt, N., Grant, N. Micropropagation of mature British wild cherry. *Pl. Cell Tiss. Org. Cult.* 47: 103–110, 1997.
- Jones, O. P., Hopgood, M. E. The successful propagation *in vitro* of two rootstocks of *Prunus*: the plum rootstock Pixy (*P. insititia*) and the cherry rootstock F12/1 (*P. avium*). *J. Hortic. Sci.* 54(1): 63–66, 1979.
- 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 Hortic.* 314: 147–154, 1992.
- Marin, J. A., Gella, R. Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) in: Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.16. Trees III.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 23–43, 1991.
- Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473–497, 1962.
- Nemeth, G. Induction of rooting. In: Bajaj Y. P. S. (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 1: Trees* (p. 49–64). Springer-Verlag, Heidelberg, 1986.
- Pevalek-Kozlina, B., Jelaska, S. Microclonal propagation of *Prunus avium* L. *Acta Hortic.* 212: 599–602, 1987.
- Popov, Y. G., Vysotskii, V. A., Trushechkin, V. G. Culture of isolated sour cherry shoot apices. *Sov Plant Physiol* 23:513–518, 1976.
- Preece, J. E., Sutter, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and the fields. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (eds) *Micropropagation.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. 71–93, 1991.
- Snir, I. *In vitro* propagation of sweet cherry cultivars. *Hort. Science* 17(2): 192–193, 1982.

The Rooting and Acclimatization of Two Fruit Tree Species – Easy-to-Root Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) and Difficult-to-Root Sweet Cherry (*Prunus avium* L.)

V. Vasar

Summary

The influence of auxin treatments on *in vitro* and *ex vitro* rooting and acclimatization of common Estonian *P. cerasus* L. and *P. avium* L. cultivars were compared. For *in vitro* rooting of *P. cerasus*, four different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) were tested: 0, 1, 3 and 8 mg/l. Auxins IBA and naphthalene acetic acid (NAA) in concentrations of 1.5, 3, 4.5 and 6 mg/l were studied for their effect on adventitious root formation of *P. avium*. In *ex vitro* rooting of *P. cerasus* 3 different IBA-pretreatments were used: shoots were dipped into 3 mg/l IBA-solution for 24 h or 48 h, or planted directly in peat:sand mixture and immediately after planting watered with 3 mg/l IBA-solution. *P. avium* rooted and unrooted shoottips were planted *ex vitro* and watered with 3 mg/l IBA-solution as well. High rooting percentage of *P. cerasus* was obtained on medium containing 3 mg/l IBA. Higher auxin concentration caused callus formation and delay in root emergence. IBA was clearly superior to NAA when used to promote *in vitro* rooting of *P. avium*. Rooting *ex vitro* with IBA pretreatment increased the survival of *P. cerasus* plantlets in greenhouse. The highest number of vigorous plants was achieved by watering microshoots with IBA solution immediately after planting to peat:sand mixture. *P. avium* microshoots showed lower survival in greenhouse conditions than the shoots of *P. cerasus*. *In vitro* rooting generally increased the number of acclimatized sweet sherry plants.