



Wpływ 6-benzylaminopuryny, hartowania chłodem oraz terminu przenoszenia kultur do przechowalni na długoterminowe przechowywanie pędów maliny „Malling Seedling” w warunkach *in vitro*

Anna Lisek, Teresa Orlikowska

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

Effect of 6-benzylaminopurine, cold-hardening and time of transfer of cultures to the storage room on long-term storage of raspberry 'Malling Seedling' shoots *in vitro*

Summary

Shoots of raspberry 'Malling Seedling' produced on multiplication medium were stored *in vitro* at 4°C in the dark on a medium with 0,4 mg/l or without 6-benzylaminopurine (BAP), for 18 and 24 months. The cultures were transferred to the storage room immediately after the subculture or after one-week incubation in the growth chamber. A part of the shoots was cold-hardened for one week. Almost all the shoots survived 24 months of storage. The shoots stored on the medium containing BAP formed shoots during storage. Shoot multiplication was poor during the first passage, especially in the result of 24 months storage. Time of transfer and hardening did not influence multiplication capacity instantly.

Key words:

in vitro storage, raspberry, 6-benzylaminopurine, cold-hardening.

Adres do korespondencji

Anna Lisek,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

1. Wstęp

Malina jest gatunkiem, który szybko ulega zawirusowaniu w uprawie polowej, z tego powodu konieczne jest częste zakła-

danie nowych mateczników z odwirusowanych sadzonek. Proces odwirusowania i testowania roślin na obecność wirusów jest długotrwały i kosztowny, dlatego rośliny wolne od wirusów powinny być chronione przed reinfekcją. Stosunkowo łatwe rozmnażanie maliny przez pędy kątowe w kulturach *in vitro* upoważnia do zaproponowania technologii reprodukcji zdrowego materiału, wykorzystującej etap mnożenia i przechowywania odwirusowanych roślin w kulturach. Warunki przechowywania powinny hamować procesy wzrostowe aby nie było konieczne częste przeszczepianie kultur na świeże pożywki, a równocześnie zapewnić zdolność pędów do rozkrzewiania i ukorzenia po przechowywaniu oraz zachowanie tożsamości genetycznej. Czynniki, które pozwalają ograniczyć wzrost pędów, to przede wszystkim niska temperatura i niskie stężenie lub brak cytokinin (1).

Dla określenia optymalnych warunków przechowywania maliny wykonano kilka doświadczeń. W pracy tej przedstawiamy wyniki doświadczenia nad wpływem obecności cytokiny w pożywce, terminu przenoszenia do chłodni oraz hartowania niską temperaturą, na zdolność do długoterminowego przechowywania pędów maliny „Malling Seedling” w 4°C, w ciemności.

2. Materiał i metody

Przechowywane pędy pochodziły ze standardowej pożywki do namnażania pędów maliny (2), zawierającej 0,8 mg/l 6-benzyloaminopuryny (BAP) i 0,1 mg/l kwasu indolilo-3-masłowego (IBA). Wierzchołkowe odcinki pędów z 3-4 liśćmi przeszczepiano na pożywkę bez BAP lub z dodatkiem 0,4 mg/l BAP. Kultury przenoszono do przechowalni bezpośrednio po przeszczepieniu, po 1 tygodniu inkubacji w fitotronie lub po hartowaniu eksplantatów przez tydzień temperaturą 0,5°C przez 16 h w nocy i 23°C przez 8 h w dzień. Po 18 i 24 miesiącach wyjmowano próbę 25 pędów i określano przeżywalność i kondycję, wg 4-stopniowej skali bonitacyjnej (tab. 1). Pędy bez objawów nekrozy przeszczepiano na pożywkę do namnażania (jw.) i przez okres 2 pasaży oceniano w fitotronie ich zdolność do tworzenia pędów bocznych (rozkrywiania), a następnie do ukorzenia. Warunki w fitotronie były następujące: oświetlenie przez 16 h na dobę światłem fluorescencyjnym o natężeniu ok. 36 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ i temperatura 23°C. Wyniki doświadczenia opracowano statystycznie przy użyciu metody analizy wariancji. Średnie w obrębie okresów przechowywania porównano przy użyciu testu Duncana.

3. Wyniki

3.1. Przeżywanie i rozkrzewianie pędów w czasie przechowywania oraz kondycja pędów po przechowywaniu

Po 18 i 24 miesiącach przechowywania pędy były wyetiologowane, a część dolnych liści i całych pędów nekrotyczna. Przechowywanie przez 18 miesięcy przeżyło 100% pędów, a przez 24 miesiące od 94% (na pożywce z BAP i przenoszone bezpośrednio po przeszczepieniu), 97% (na pożywce z BAP i przenoszone po tygodniu) do 99% (pozostałe), przy czym różnice nie były istotne statystycznie. Najlepszą kondycję (najmniejszy udział liści i pędów nekrotycznych) stwierdzono w kulturach przechowywanych na pożywce bez BAP i przenoszonych do chłodni bezpośrednio po przeszczepieniu. Wśród kultur przechowywanych przez 24 miesiące istotnie najwięcej nekroz obserwowano w kombinacji na pożywce z BAP, przenoszonej bezpośrednio po przeszczepieniu do chłodni (tab. 1 i 2).

Tabela 1

Wpływ BAP, hartowania temperaturą oraz terminu przenoszenia kultur do chłodni na przechowywanie pędów maliny „Malling Seedling” przez 18 i 24 miesiące, w 4°C w ciemności

Warunki przechowywania	Kondycja pędów (skala 0-3)*		Ogólna liczba pędów po przechowywaniu		Średnia liczba pędów bocznych/ /1 pęd w 1 pasażu		Średnia liczba pędów bocznych/ /1 pęd w 2 pasażu		Łączna liczba pędów z 2 pasażu	
	okres przechowywania w miesiącach		okres przechowywania w miesiącach		okres przechowywania w miesiącach		okres przechowywania w miesiącach		okres przechowywania w miesiącach	
	18	24	18	24	18	24	18	24	18	24
A1B1	1,8 b	1,8 d	1,0 a	1,0 a	2,4 a	1,7 a	8,2 ab	3,5 a	19,7	5,9
A1B2	1,7 ab	1,6 c	1,2 ab	1,2 a	2,0 a	1,5 a	8,1 ab	3,2 a	19,4	5,8
A1B3	1,6 ab	1,5 bc	1,1 ab	1,2 a	2,1 a	1,4 a	8,4 ab	3,7 a	19,4	6,2
A2B1	1,5 a	1,2 a	1,4 bc	1,2 a	2,1 a	1,4 a	10,0 b	2,9 a	29,4	4,9
A2B2	1,5 a	1,4 b	1,6 c	1,6 b	1,9 a	1,6 a	8,5 ab	3,8 a	25,8	9,7
A2B3	1,5 a	1,5 bc	2,2 d	1,9 c	1,7 a	1,5 a	6,5 a	3,4 a	24,3	9,7

A1 – BAP 0, A2 – BAP 0,4 mg/l, B1 – przenoszenie do chłodni bezpośrednio po przeszczepieniu,

B2 – po jednym tygodniu, B3 – po hartowaniu.

* Skala bonitacyjna: 0 – cały eksplantat nekrotyczny, 1 – nekroza ponad 50% eksplantatu, 2 – nekroza mniej niż 50% eksplantatu, 3 – brak objawów nekrozy. Porównywano średnie w obrębie okresu przechowywania. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie.

Tabela 2

Analiza wariancji doświadczenia nad przechowywaniem kultur pędowych maliny „Malling Seedling” *in vitro*

Źródło	Przeżywanie	Kondycja	Liczba pędów po przechowywaniu	Liczba pędów w I pasażu	Liczba pędów w II pasażu
po 18 miesiącach					
A	b.r.	**	**	b.r.	b.r.
B	b.r.	b.r.	**	b.r.	b.r.
A × B	b.r.	b.r.	**	b.r.	b.r.
po 24 miesiącach					
A	b.r.	**	**	b.r.	b.r.
B	b.r.	b.r.	**	b.r.	b.r.
A × B	b.r.	**	*	b.r.	b.r.

A – wpływ obecności BAP, B – wpływ terminu przenoszenia do chłodni; ** wpływ istotny przy $P = 0,01$, * przy $P = 0,05$, b.r. – brak różnic.

Zarówno obecność BAP w pożywce, jak i okres przeniesienia do chłodni po przeszczepieniu miały istotny wpływ na liczbę pędów wytworzonych w czasie przechowywania. Pędy wyszczepione na pożywkę z BAP i przeniesione do chłodni po tygodniu przebywania w fitotronie lub hartowane, tworzyły więcej pędów w czasie przechowywania (tab. 1 i 2).

3.2. Rozkrzewianie i ukorzenianie pędów po przechowywaniu

Zdolność do rozkrzewiania pędów pochodzących z kultur przechowywanych przez 18 miesięcy była wyższa w obydwu pasażach (średnio 2,0 w pierwszym i 8,2 w drugim pasażu) aniżeli pędów pochodzących z kultur przechowywanych przez 24 miesiące (średnio 1,5 w pierwszym i 3,4 w drugim pasażu). Nie stwierdzono istotnych różnic w liczbie pędów wytworzonych w pierwszym pasażu w zależności od warunków przechowywania, ani w drugim pasażu po przechowywaniu przez 24 miesiące. Pędy pochodzące z kultur przebywających w chłodni przez 18 miesięcy rozkrzewiały się w drugim pasażu najlepiej, gdy były przechowywane na pożywce z BAP i bezpośrednio przenoszone do chłodni, a najgorzej, gdy były hartowane na pożywce z BAP (tab. 1). Średnia liczba pędów z jednego pędu pochodzącego z kultur przeszczepianych co miesiąc na pożywkę do namnażania i przebywających przez dłuższy czas w fitotronie wynosiła 4,5 (dane z czterech kolejnych pasaży). Łącznie z dwóch pasaży uzyskano średnio 23 pędy z jednego pędu przechowywanego przez 18 miesięcy i 7 pędów z pędu przechowywanego przez 24 miesiące.

Pędy uzyskane w drugim pasażu z pędów przechowywanych przez 18 miesięcy ukorzeniały się w 100%, natomiast te uzyskane z pędów przechowywanych przez 24 miesiące ukorzeniały się nieco gorzej – od 97,2 do 99,8%, w zależności od warunków przechowywania, ale różnice nie były istotne.

4. Dyskusja

Obecność cytokininy w pożywce w czasie przechowywania może w istotny sposób oddziaływać na eksplantaty w czasie i po przechowywaniu w chłodni. Brak BAP w pożywce zwiększał ryzyko nekrozy kultur karłowych podkładek jabłoni (3) i topoli (4). Kultury *Prunus* (5), *Prunus* i *Malus* (6 i 7), truskawki (8), kiwi (9) przechowywano na pożywkach z cytokinina, a kultury truskawki i maliny na pożywkach bez cytokininy (10-13). Autorzy nie dyskutowali innych możliwości i nie sprawdzali zdolności kultur do namnażania po przechowywaniu. Jest to ważna cecha, która wskazuje, ile pędów należy zdeponować w przechowalni aby w odpowiednim czasie rozmnożyć je do liczby zamówionej przez szkółkarzy. W naszym doświadczeniu, pędy przechowywane na pożywce z BAP miały nieco gorszą kondycję i nieco mniej z nich przeżyło przechowywanie przez 24 miesiące, ale te, które przeżyły, były lepiej rozkrzewione i w rezultacie liczba pędów po dwóch pasażach była większa.

Czynnikiem modyfikującym może być także termin przenoszenia kultur do przechowalni. Trzypędowe eksplantaty podkładki M 9 przenoszone do chłodni bezpośrednio po przeszczepieniu lepiej przeżywały i regenerowały po 7 miesiącach przechowywania niż przenoszone do chłodni po 10 lub 20 dniach (3). Pędy wierzchołkowe topoli tworzyły więcej pędów po 3 miesiącach przechowywania, gdy były przenoszone do chłodni po 7 i 14 dniach niż bezpośrednio lub po 28 dniach (14). W naszym doświadczeniu termin przenoszenia kultur do chłodni nie miał wpływu na przeżywalność, namnażanie i ukorzenianie pędów, jeśli były one przechowywane na pożywce bez cytokininy. Kultury przechowywane na pożywce z dodatkiem BAP wytwarzały więcej pędów w czasie przechowywania, gdy były przenoszone do chłodni po jednym tygodniu inkubacji w fitotronie lub po jednym tygodniu hartowania, niż bezpośrednio. Jest to zrozumiałe, ponieważ wyższa temperatura w czasie pierwszego tygodnia zaindukowała wzrost pędów kątowych.

Na przeżywalność pędów może mieć także wpływ hartowanie niską temperaturą przed umieszczeniem kultur w chłodni. Reed (10,11) poleca 1-tygodniowe hartowanie kultur maliny i truskawki temperaturą -1°C przez 16 h w czasie nocy, rozpoczynające się w tydzień po przeszczepieniu. W naszym doświadczeniu hartowanie nie miało wpływu na liczbę pędów przeżywających ani na ich kondycję.

Bardzo ważny, jak się okazało, był wpływ czasu przechowywania na późniejszą zdolność pędów do namnażania. W doświadczeniach Borkowskiej (15) nad przechowywaniem kultur pędowych wiśni w ciemności, w 4°C , przez 30 tygodni, najlepiej rozkrzewiały się pędy przechowywane przez 4 tygodnie. Potem zdolność ta zmniejszała się, osiągając minimum przy przechowywaniu przez 12-20 tygodni, a następnie wzrastała aż do 28 tygodnia. W naszym doświadczeniu także zaobserwowano zależność rozkrzewiania od czasu przechowywania. Pędy pochodzące z kultur przechowywanych przez 18 miesięcy rozkrzewiały się nieco lepiej w pierwszym pasażu i 2-3 razy lepiej w drugim pasażu, niż pędy pochodzące z kultur przechowywanych przez 24 miesiące. Zdolność do rozkrzewiania w pierwszym pasażu po przechowy-

waniu zmniejszyła się znacznie w porównaniu do rozkrzewiania pędów nie przechowywanych. W drugim pasażu pędy pochodzące od przechowywanych przez 18 miesięcy tworzyły dwukrotnie więcej pędów niż ciągle przeszczepiane, natomiast pędy przechowywane przez 24 miesiące ciągle miały znacznie niższą zdolność do rozkrzewiania niż pędy nie przechowywane.

5. Wnioski

Pędy maliny bardzo dobrze przechowywały się w kulturach *in vitro* w ciemności, w temperaturze 4°C, przez okres 24 miesięcy. Zdolność pędów do namnażania była znacznie wyższa po 18 miesiącach niż po 24 miesiącach przechowywania. Dodatek 0,4 mg/l BAP do pożywki zwiększał zdolność rozkrzewiania w czasie przechowywania, jeśli kultury przeniesiono do chłodni po jednym tygodniu od przeszczepienia. Zdolność do ukorzeniania pędów po drugim pasażu namnożeniowym praktycznie wykazały wszystkie pędy, niezależnie od warunków przechowywania. Otrzymane wyniki wskazują, że przechowywanie kultur maliny w warunkach *in vitro* w chłodni przez 18 miesięcy, na pożywce zawierającej 0,4 mg/l BAP można wykorzystać praktycznie w reprodukcji materiału elitarnego, przeznaczonego do nasadzeń mateczników polowych.

Literatura

1. Lisek A., Orlikowska T., (2001), *Biotechnologia*, 3(54), 134-144.
2. Lisek A., Orlikowska T., (1999), VIII Ogólnopolski Zjazd Naukowy Hodowców Roślin Ogrodniczych *Hodowla roślin ogrodniczych u progu XXI wieku*, Lublin, 315-318.
3. Orlikowska T., (1992), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31, 1-7.
4. Sung Ho Son, Young Woo Chun, Hall R. B., (1991), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 161-168.
5. Marino G., Rosati P., Sagrati F., (1985), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, 73-78.
6. Eckhardt A., (1989), *Arch. Gartenbau*, 37, 131-140.
7. Lundergan C., Janick J., (1979), *HortScience*, 14, 514.
8. Mullin R. H., Schlegel D. E., (1976), *HortScience*, 11, 100-101.
9. Monette P. L., (1986), *HortScience*, 21, 1203-1205.
10. Reed B. M., (1991), *Plant Cell Reports*, 10, 431-434.
11. Reed B. M., (1992), *Fruit Varieties Journal*, 46, 98-102.
12. Reed B. M., (1993), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118, 890-895.
13. Vysockaja O. N., (1994), *Fizjologia Rastienij*, 41, 935-941.
14. Hausman J. F., Neys O., Kevers C., Gaspar T., (1994), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 65-67.
15. Borkowska B., (1990), *Fruit Science Reports*, 1, 1-7.