

Skirtingų braškių veislių atsparumo šalčiui vertinimas modifikuotomis sąlygomis

Vanda Lukoševičiūtė*¹, Adomas Vitas²

¹Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodas

Ž. E. Žilibero g. 6, LT-46324 Kaunas

Tel. +370 37 390033, el. paštas v.lukoseviciute70@gmail.com

²Vytauto Didžiojo universiteto GMF Aplinkos tyrimų centras,

Dendroklimatologinių ir radiometrinių tyrimų grupė. Ž. E. Žilibero g. 6, LT-46324, Kaunas

(Gauta 2015 m. sausio mėn.; atiduota spaudai 2015 m. balandžio mėn.; prieiga internete nuo 2015 m. gegužės 04 d.)

Anotacija

Straipsnyje aptariami skirtingų braškių veislių atsparumo šalčiui vertinimas modifikuotomis sąlygomis. Braškės užima svarbią vietą tarp uoginių augalų pasaulyje. Siekiant pasirinkto tikslo buvo analizuota agarizuotos maitinamosios terpės sąsaja su augalų būkle šaldymo metu. Atlikti tyrimai siekiant įvertinti skirtingų braškių veislių atsparumą šalčiui. Straipsnyje pateikiama skirtingų braškių veislių kritinė temperatūra, diferencijuojanti jas pagal atsparumą šalčiui.

Reikšminiai žodžiai: braškė, mikroūglis, užsigrūdinimas, veislė, terpė.

Abstract

The evaluation of cold hardiness of different strawberries varieties under altered conditions is discussed in the article. Strawberries have an important role among berry plant in the world. In order to pursue the aim, the relationship between the nutrient agar medium with plant status during the chilling time was analysed. In order to assess the cold hardiness of different strawberry varieties, the investigation was carried out. In the article is presented critical temperature of different strawberries varieties by differentiating them according to cold hardiness.

Key words: strawberry, micro-shoots, cold acclimation, variety.

Įvadas

Pasaulyje braškės priskiriamos prie vienu populiariausių, vertingiausių augalų dėl plastiškumo, prisitaikymo bei genetinio heterozigotiškumo (Luby, Hancock et al., 2008; Hummer, Hathewet et al., 2009, Hummer, Bassil et al., 2011). Pastaraisiais dešimtmečiais aktualiais ir analizuojamais klausimais tampa antropogeninių aplinkos veiksnių bei klimato poveikio augalams sukėlimas. Padidėjus šių stresinių veiksnių poveikiui, reikšmingai mažėja augalų produktyvumas.

Svarbiausias augalų žiemojimo komponentas yra atsparumas šalčiams. Atsparumas šalčiui apibūrinamas kaip sudėtingas kompleksinis požymis. Priklausomai nuo stresoriaus trukmės ir stiprumo bei periodiškumo priklauso koks bus augalo atsakas į stresą (Beck, Heim et al., 2007). Tyrimais ir išvadomis yra pagrįsta, kad nėra bendro atsparumo šalčiui mechanizmo, kuris būtų būdingas visiems augalams (Gilmour, Sebolt et al., 2000; Quellet, 2007; Pérez-Clemente, Gómez-Cadenas, 2012; Miura, Furumoto, 2013). Kaip labai svarbios savybės yra įvardinamas braškių išsvermingumas žiemą bei sugebėjimas prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų. Augalų grūdinimosi metu, esant žemoms teigiamoms temperatūroms, formuojasi augalų atsparumas šalčiui (Quellet, 2007). Tiek braškių užsigrūdinimas, tiek atsparumas šalčiui yra labai svarbūs atrankai bei naujų veislių kūrimui. Tiriant augalus kontroliuojamomis sąlygomis *in vitro*, galima iširti atskirų veiksnių įtaką užsigrūdinimui bei atsparumui šalčiui, atsiribojant nuo, neišvengiamo natūraliomis sąlygomis, daugelio įvairių veiksnių poveikio.

Siekiant įvertinti augalo atsparumą šalčiui yra keletas būdų: kai galima šaldyti augalą kontroliuojamomis sąlygomis ir įvertinti žemų temperatūrų pažeidimus; atskiriems išsvermingumo žiemai savybės komponentams nustatyti kai kontroliuojamas šaldymas; pasikartojančių užšalimo-atšilimo ciklų daromiems pažeidimams įvertinti elektrinės varžos spektrometrija. Vienu objektyviausių metodu, siekiant įvertinti augalo atsparumą šalčiui, laikomas tiesioginio šaldymo

metodas. Taip pat yra galimybė atrinkti atsparias šalčiui augalų veisles *in vitro*, modifikuojant maitinamąją terpę.

Klimato sąlygos kinta nepriklausomai nuo žmogaus, tačiau parinkus tinkamai augalus, jų veisles, taikant atitinkamas atrankos modeliavimo technologijas taip yra padidinamas su augalų adaptyvumu susijęs produktyvumas.

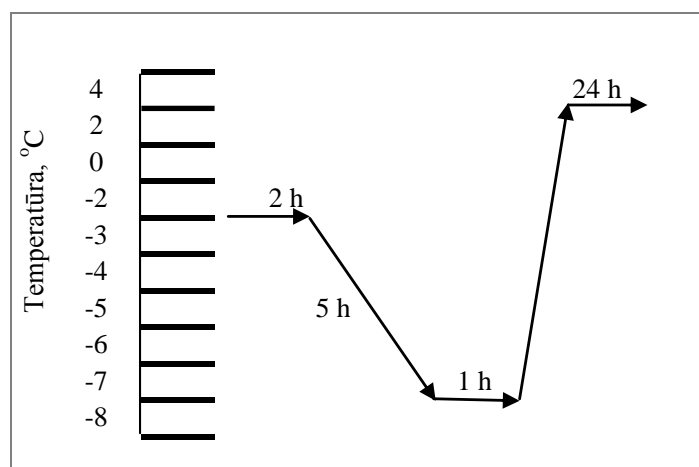
Straipsnio tikslas – įvertinti skirtingų braškių veislių atsparumą šalčiui modifikuotomis sąlygomis, panaudojant agarizuotą maitinamąją terpę bei konduktometriniu metodo privalumus.

Tyrimo metodika

Atsparumo šalčiui tyrime naudotos daržinės braškės (*Fragaria x ananassa* Duch) veislės ‘Melody’ (atspari šalčiui) ir ‘Elsanta’ (neatspari šalčiui). Tyrimai atlikti 2010 metais LAMMC SDI Sodo augalų genetikos ir biotechnologijos skyriuje.

Braškių mikroūgliai klimato kameroje auginti stiklinėse kolbutėse (130 ml), mėgintuvėliuose (15 x 1,5 cm) ant agarizuotos Murashige & Skoog terpės (Murashige, Skoog, 1962) su 0,75 mg l⁻¹ BAP, 3,0 % sacharozė, 0,8 % agaru, pH 5,81. Mikroūgliai auginti 1,5 mėnesio 22±3 °C temperatūroje, naudojant 50-150 μmol·m⁻²·s⁻¹ intensyvumo apšvietimą fluorescencinėmis lempomis 16/8 h dienos / nakties fotoperiodu, esant 60 % santykiniam oro drėgnumui. Šaldymo testo tyrimams mikroūgliai auginti 7 paras anksčiau minėtomis sąlygomis.

Atliekant *šaldymo testą* braškių mikroūgliai buvo šaldomi pagal modifikuotą Skinner ir Mackey protokolą (Skinner, Mackey, 2009). Šaldymo testas atliktas programuojamoje klimato kameroje Persival LT-36VL. Šaldymo testo schema pateikiama 1 paveiksle. Po šaldymo mikroūgliai perkeliama į žemų teigiamų temperatūrų kamerą, kurioje dejonizuotame vandenyje laikoma 24 h esant 8/16 h diena / naktis fotoperiodui.



1 pav. Šaldymo testo schema

Fig. 1 Scheme of chilling test

Braškių mikroūglių audinių būklė įvertinta konduktometriiniu metodu, naudojant konduktometrą InoLab Cond 720 WTW, matuojant tirpalo elektrinį laidumą. Vėliau, po autoklavavimo, įvertintas bendras jonų kiekis, nešaldytų ir maksimaliai sušaldytų (–20 °C, 6 h) braškių mikroūglių atžvilgiu, nustatytas jonų išlaisvinimo procentinis santykis. Santykinis jonų išlaisvinimas apskaičiuotas pagal T:

$$SJI_T = (JI_T / EL_{AUTOKL}) \times 100 \%, \quad (1)$$

čia: JI_T – bandinio jonų išlaisvinimas temperatūroje T;

EL_{AUTOKL} – bandinio jonų išlaisvinimas po autoklavavimo.

Pažeidimo indeksas temperatūroje T:

$$IT = [(SJI_T - SJI_{KONTR}) / (100 - SJI_{KONTR})] \times 100 \%, \quad (2)$$

čia: SJI_{KONTR} – santykinis jonų išlaisvinimas kontroliniuose – nešaldytuose mikroūgliuose.

Pažeidimas normalizuotas temperatūroje T:

$$(IT / I_{-20}) \times 100 \%, \quad (3)$$

čia: I_{-20} – bandinių, šaldytų -20°C temperatūroje pažeidimo indekso vidurkis (Linden, 2002).

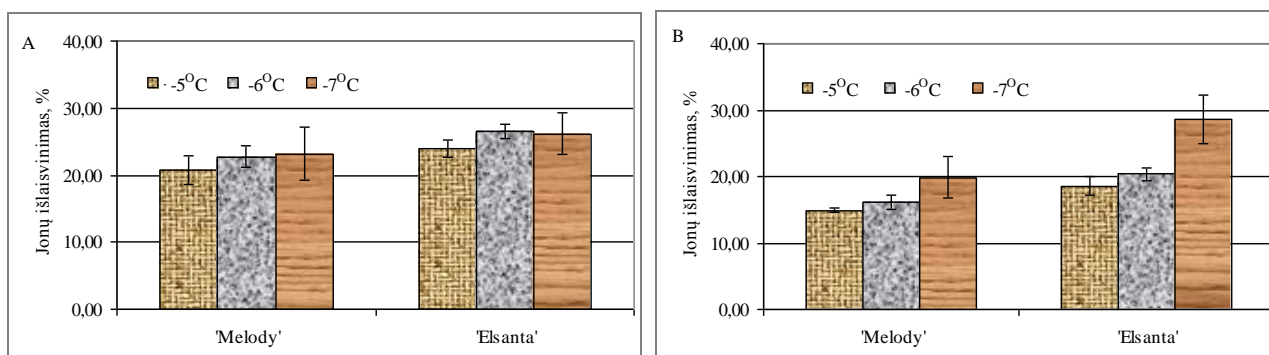
Apskaičiuojant jonų išlaisvinimą, atitinkantį 50 % mikroūglių žuvimą, po šaldymo, praėjus 30 parų vizualiai buvo nustatomas mikroūglių pažeidimo laipsnis, balais ir išgyvenusių / žuvusių mikroūglių kiekis, procentais (Lukoševičiūtė, Stanienė ir kt., 2011).

Panaudojant programinius paketus MS Excel ir Statistica 7.0. atlikta tyrimo duomenų statistinė analizė. Rezultatuose pateikiami matavimų vidurkiai, standartinės vidurkio paklaidos. Duomenų patikimumas įvertintas vienfaktorinės dispersinės analizės metodu panaudojant kompiuterinę programą ANOVA (Tarakanovas, Raudonius, 2003).

Rezultatai ir jų aptarimas

Įvairių augalų genotipų derinių daug selekcinės medžiagos yra sukuriama selekcijos proceso metu. Vidutinio klimato juostoje dėl besikeičiančių klimatinių sąlygų, norint patikimai įvertinti augalų ištvermingumą žiemą būtini keliolika metų trunkantys stebėjimai bei tyrimai. Kuriami nauji ir modeliuojami ir augalų atrankos metodai, sutrumpinti selekcijos proceso trukmę bei sumažinant sąnaudas (Qamme, 1991; Rugienius, Lukoševičiūtė ir kt., 2008). Tiriant skirtingų braškių veislių 'Melody' (atspari šalčiui) ir 'Elsanta' (neatspari šalčiui) atsparumą šalčiui *in vitro* buvo siekiama išsiaiškinti, kokią įtaką tam turi agarizuota Murashige & Skoog maitinamoji terpė.

Tyrimui braškių mikroūgliai buvo šaldyti stikliniuose mėgintuvėliuose su terpe ir be jos. Šaldymo testui braškių mikroūgliai buvo šaldyti stikliniuose mėgintuvėliuose su maitinamąja terpe ir be jos (2 pav.).



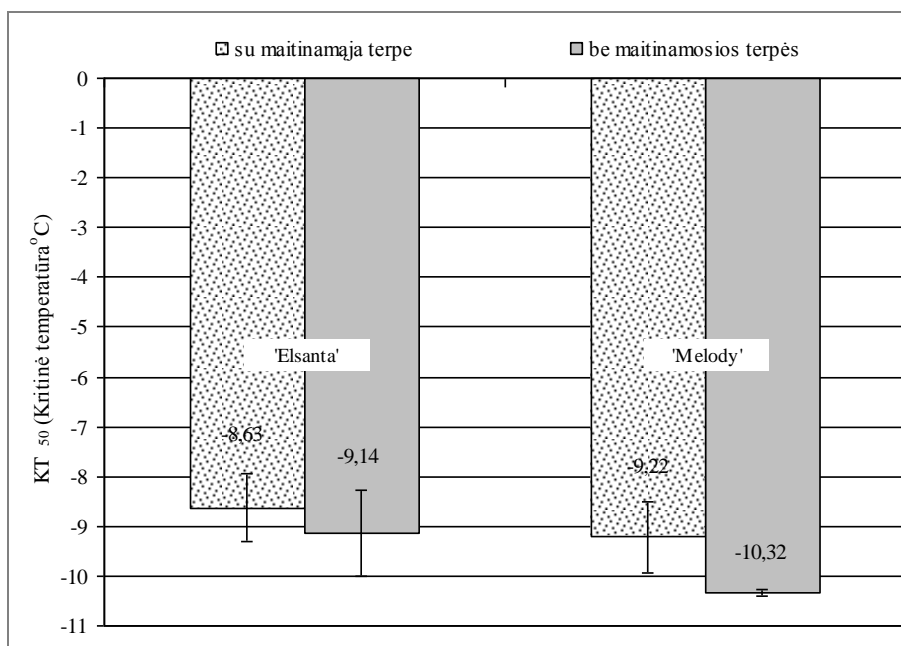
2 pav. Braškių mikroūglių jonų išlaisvinimas po šaldymo: A) su MS terpe, B) be MS terpės, 1 valandą klimato kameroje *in vitro*

Fig. 2. Ion leakage of strawberries micro-shoots after chilling: (A) with MS medium, (B) without MS medium, 1 hour in climate chamber, *in vitro*

Braškių mikroūglių šaldymo tyrimų rezultatai parodė, kad šaldytų be MS maitinamosios terpės braškių mikroūglių kritinė temperatūra buvo laipsniu didesnė nei šaldant su terpe, tačiau skirtumai nebuvo esminiai. Išryškėjo skirtumai tarp skirtingo atsparumo šalčiui braškių veislių.

Siekiant tikslesnio ir objektyvesnio atsparumo šalčiui vertinimo, mūsų tyrime panaudotas konduktometrinis metodas, matuojant jonų išlaisvinimą (jonų išėigą iš ląstelės) po šaldymo. Soleimani su bendraautoriais (2003); Imani su bendraautoriais (2011); Bajji su bendraautoriais (2001); Vaguifalvi su bendraautoriais (2010) šį metodą plačiai naudojo augalų šalčio sukeltiems pažeidimams įvertinti.

Nustatyta, kad atsparių šalčiui braškių veislės ‘Melody’ KT_{50} absoliuti reikšmė lyginant su neatsparios – ‘Elsanta’ padidėjo 1,18 °C variante, kur nepanaudota MS terpė ir 0,59 °C variante, kur panaudota MS terpė (3 pav.).



3 pav. Braškių mikroūglių kritinė temperatūra šaldant su MS maitinamąja terpe ir be terpės, *in vitro*

Fig. 3. The critical temperature of strawberries micro-shoots during chilling with MS nutrition medium and without medium, *in vitro*

Atliekant augalų atsparumo šalčiui tyrimus audinių pažeidimo vertinimui naudojamas šaldymas kontroliuojamomis (modifikuotomis) sąlygomis ir kritinė pažeidimo temperatūra dažniausiai nustatoma konduktometrinis metodas pagal jonų išėigą iš ląstelės.

Atlikus braškių mikroūglių šaldymą ir išmatavus jonų išėigą iš ląstelių, apskaičiuota audinių pažeidimo kritinė temperatūra. Nustatyta, kad žemiausia kritinė temperatūra ‘Melody’ veislės mikroūglių yra mažesnė nei neatsparios šalčiui ‘Elsanta’. ‘Melody’ veislė yra atsparesnė žemos temperatūros poveikiui. Tačiau sprendžiant augalų adaptyvumo problemą, kad ir mažas postūmis į priekį yra reikšmingas.

Konduktometrinis metodas tinka augalų skirtingiems genotipams diferencijuoti pagal atsparumą šalčiui ir apskaičiuoti kritinę temperatūrą, kuriai esant išgyvena 50 % augalų.

Išvados

1. Nustatyta, kad braškių mikroūglius šaldant be Murashige & Skoog maitinamosios terpės *in vitro*, išryškėja skirtumai tarp skirtingo atsparumo šalčiui braškių veislių.
2. Nustatyta, kad atsparių šalčiui braškių veislės ‘Melody’ KT_{50} absoliuti reikšmė lyginant su neatsparios – ‘Elsanta’ padidėjo 1,2 °C variante, kur nepanaudota Murashige & Skoog terpė ir 0,6 °C variante, kur terpė panaudota.

Literatūra

1. Bajji M., Kinet J.-M. and Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, 00: 2001. P. 1–10.
2. Beck E.H, Heim R. & Hansen J. Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *Journal of Biosciences*, 29, 2007. P. 449-459.
3. Gilmour S.J., Sebolt A.M., Salazar M.P., Everard J.D. and Thomashow M.F. Overexpression of the Arabidopsis *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology*, 124(4), 2000. P. 1854–1865.
4. Hummer K.E., Bassil N. and Njuguna W. *Fragaria*. C. Kole (ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Temperate Fruits*, 2011. P. 17–44.
5. Hummer K. E., Nathewet P. and Yanagi T. Decaploidy in *Fragaria iturupensis* (Rosaceae). *American Journal of Botany*, 96(3), 2009. P. 713–716.
6. Imani I. Barzegar K. and Piripireivatlou S. Relationship Between Frost Injury and Ion Leakage as in Indicator of Cold Hardiness in 60 Almond Selection. *International Journal of Nuts and Related Sciences*, 2(1), 2011. P. 22–26
7. Linden L., Palonen P., Hytonen T. Evaluation of three methods to assess winter-hardiness of strawberry genotypes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77, 2002. P. 580–588.
8. Luby J., Hancock J., Dale A. and Serçe S. Reconstructing *Fragaria* × *ananassa* utilizing wild *F. virginiana* and *F. chiloensis*: inheritance of winter injury, photoperiod sensitivity, fruit size, female fertility and disease resistance in hybrid progenies. *Euphytica*, 163, 2008. P. 57–65.
9. Lukoševičiūtė V., Staniienė G., Blažytė A., Sasnauskas A., Gelvonauskienė D., Baniulis D., Rugienius R. Angliavandenių įtaka kultūrinių kriaušių mikroūglių užsigrūdinimui žemoje temperatūroje. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 30(3–4). Baltai, 2011. 17–27.
10. Miura K., Furumoto T. Cold signaling and cold response in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 6;14(3), 2013. P. 5312–5337.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 1962. P. 473–497.
12. Ouellet F. Cold acclimation and freezing tolerance in plants. In Wingler, A. (ed.). *Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Binghamton, NY*. 2007. P. 1–6.
13. Pérez-Clemente R.M. and Gómez-Cadenas A. *In vitro* tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions. *Recent Advances in Plant In Vitro Culture*, 2012. 91–108.
14. Qamme H.A. Application of thermal analyses to breeding fruit crops for improved cold. *Hortsciense*, 26, 1991. P. 513–517.
15. Rugienius R. Atsparių šalčiui braškių sėjinukų atrankos technologijų *in vitro*, *in vivo* ir *in situ* palyginimas. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 19(2), 2000. P. 3–10.
16. Rugienius R., Lukoševičiūtė V., Staniienė G., Stanys V. Žemės ūkio augalų atsparumo šalčiui tyrimai *in vitro*. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 27(3), 2008. P. 47–61.
17. Skinner D. Z., Mackey B. Freezing tolerance of winter wheat plants frozen in saturated soil. *Field Crops Research*, 113(3), 2009. P. 335–341.
18. Soleimani A., Lessani H. and Talaie A. Relationship between stomatal density and ionic leakage as indicators of cold hardiness in Olive (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturae*, 618, 2003. P. 512–525.
19. Tarakanovas P., Raudonius S. Agronominių tyrimų duomenų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, SPILT-PLOT iš paketo SELEKCIJA ir IRRISTAT. Akademija, Kėdainių r., 2003.
20. Vaguifalvi A., Nagy V.A., Soltesz A. and Galiba G. Simplified method to test cereal frost tolerance. *Acta Agronomica Hungarica*, 58(2), 2010. P. 143–149.

Evaluation of the Cold Hardiness of Different Strawberries Varieties under Modified Conditions

(Received in January, 2015; Accepted in April, 2015; Available Online from 4th of May, 2015)

Summary

The cold acclimation and cold hardiness of strawberries are important not only for selection. New strawberry varieties have been originated in the world every year. Better knowledge on the biology of cold acclimation and cold hardiness enables to create substantial new and to improve the existing methods of selection to create varieties with higher adaptation.

The cold hardiness of strawberries under different conditions *in vitro* was investigated in the Department of Orchard Plant Genetics and Biotechnology, Institute of Horticulture Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in 2010. Varieties of strawberries used in the study: ‘Elsanta’ (not resistant in winter) and ‘Melody’ (resistant in winter). During the investigation of the cold hardiness of plants, the chilling under the controlled (modified) conditions was used to assess the disturbance of tissues, and critical temperature was determined by ion leakage from the cell by using the conductometric method. After the chilling of strawberries micro-shoots and measured of ion discharge from the cells, the critical temperature of the disturbances of tissues was calculated. The lowest critical temperature was established for micro-shoots of strawberry varieties ‘Melody’ and ‘Elsanta’.

The influence of agarized nutrient medium Murashige & Skoog (MS) to the cold hardiness of strawberries was assessed by measuring and calculating the ion discharge from micro-shoots of strawberries after chilling *in vitro*. During the research, micro-shoots of strawberries were chilled in glass tubes with nutrient medium and without the medium. The results of the chilling of strawberries micro-shoots have shown that the critical temperature of strawberries micro-shoots chilled without MS nutrient medium was lower by 1 C in comparison with chilling in the nutrient medium. However, the differences were not significant. However, dealing with the problem of plant adaptivity, even the small push through is significant. The differences between different varieties of strawberries to cold hardiness have exposed.