

WZROST KULTUR *in vitro* BORÓWKI WYSOKIEJ (*Vaccinium × corymbosum* L.) W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU I STĘŻENIA CUKRU ORAZ DODATKU POŻYWKI PŁYNNEJ

Wojciech Litwińczuk

Katedra Produkcji Roślinnej, Uniwersytet Rzeszowski

Wstęp

Standardowo prowadzone kultury *in vitro* wymagają obecności cukru w pożywce. Przeważnie w mikrorozmnażaniu roślin używa się sacharozę. W wielu badaniach stwierdzono jednak, że kultury niektórych gatunków wyraźnie preferują inne cukry. W dostępnych bazach danych (Current Contents, TreeCD, HortCD, BiotechnologyCD) nie znaleziono informacji dotyczących reakcji kultur *Vaccinium* na rodzaj cukru, w przeciwieństwie do licznych doniesień o zróżnicowanych preferencjach innych gatunków roślin co do rodzaju i stężenia cukru w pożywce. Celem doświadczeń było określenie, który z testowanych cukrów (sacharoza, glukoza, fruktoza, sorbitol) umożliwi najbardziej wydajne rozmnażanie pędów kątowych borówki wysokiej. W kulturach wielu roślin dobre wyniki dało zastosowanie pożywki dwufazowej, która m.in. ułatwia hydrolizę sacharozy do cukrów prostych i pobieranie cukrów przez kultury [LITWIŃCZUK 2000]. W związku z tym badano też przydatność takiej pożywki w etapie proliferacji kultur borówki wysokiej.

Materiał i metody

W pracy prezentowane są wyniki trzech doświadczeń przeprowadzonych na pędowych kulturach borówki wysokiej (*Vaccinium × corymbosum* L.) odmiany 'Herbert'. Kontrolę we wszystkich doświadczeniach stanowiły kultury rosnące na pożywce ZB [ZIMMERMAN, BROOME 1980] z dodatkiem sacharozy (30,0 g·dm⁻³), IAA (4,0 mg·dm⁻³), 2iP (15,0 mg·dm⁻³), siarczanu adeniny (80,0 mg·dm⁻³), zestawionej mieszanką agarów Bacto-Difco (3,2 g·dm⁻³) i Kobe I (3,2 g·dm⁻³) w objętości 30 ml na 100 ml kolbkę Erlenmayera. W dwóch pierwszych doświadczeniach testowano pożywki różniące się od kontroli stężeniem lub/i rodzajem cukru. Modyfikacja składu pożywki podana jest w tabelach 1 i 2. Badaną w trzecim doświadczeniu pożywkę dwufazową otrzymano przez wylanie 10 ml płynnego roztworu ZB na pożywkę kontrolną. Kultury założone z węzłowych odcinków pędów (ok. 6 mm) były prowadzone przy świetle zimno-białym (Osram) o PPF_D 26,4 μmol·m⁻²·s⁻¹, fotoperiodzie 16 godz./8 godz. (dzień/noc) i temperaturze 26±1°C przez 8 tygodni. Obiekt doświadczalny reprezentowany był przez 40 kultur. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. Zastosowano metodę

analizy wariancji z użyciem przedziałów ufności NIR przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

W prezentowanych doświadczeniach stwierdzono wyraźny wpływ rodzaju i stężenia cukru na wzrost i rozwój kultur borówki wysokiej. Wzrost kultur pędów kątowych był porównywalny do kontroli na pożywkach z dodatkiem sacharozy w koncentracji 20–50 g·dm⁻³, znacznie gorszy zaś w stężeniach przekraczających ten zakres (tab. 1). Zwiększanie koncentracji sacharozy powodowało stopniowe zmniejszanie

Tabela 1; Table 1

Wzrost pędów merystematycznych i przybyszowych w zależności od stężenia sacharozy
Growth of auxillary and adventitious shoots depending on concentration of sucrose

Stężenie sacharozy Concentration of sucrose	LR ¹⁾ (szt.; pcs)	LD (szt.; pcs)	LP (szt.; pcs)	LDD (mm)	LPP (1–5)	WPP (1–5)
10 g·dm ⁻³ (0,029 mol·dm ⁻³)	3,4 a ²⁾	2,5 ab	5,9 a	47 a	3,1 d	2,4 b
20 g·dm ⁻³ (0,058 mol·dm ⁻³)	4,1 b	4,3 c	8,3 b	94 b	3,0 cd	2,7 cd
K ³⁾ : 30 g·dm ⁻³ (0,088 mol·dm ⁻³)	4,2 bc	4,3 c	8,5 b	103 b	2,6 bc	2,9 d
40 g·dm ⁻³ (0,117 mol·dm ⁻³)	4,4 c	3,5 bc	7,9 b	85 b	2,4 ab	2,7 bcd
50 g·dm ⁻³ (0,146 mol·dm ⁻³)	4,4 c	3,4 bc	8,0 b	84 b	2,3 ab	2,5 bc
60 g·dm ⁻³ (0,175 mol·dm ⁻³)	4,3 bc	2,2 a	6,5 a	50a	2,1 a	2,0 a

- 1) – LR – liczba pędów krótkich < 15 mm; number of short shoots < 15 mm, LD – liczba pędów długich > 15 mm; number of long shoots > 15 mm, LP – łączna liczba pędów; total number of shoots, LDD – łączna długość pędów długich; total length of long shoots, LPP – ocena liczby pędów przybyszowych; estimation of adventitious shoots number: 1 – brak; lack, 5 – więcej niż 20; more than 20, WPP – ocena wielkości pędów przybyszowych; estimation of adventitious shoots size: 1 – brak; lack, 2 – krótsze od 1 mm; shorter than 1 mm, 5 – zbliżone do pędów kątowych; similar to auxillary shoots
- 2) – średnie w kolumnach oznaczone odmiennymi literami różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$; the means followed by various letters within a column are significantly different at $\alpha = 0,05$,
- 3) – K – kontrola; control

Tabela 2; Table 2

Wzrost pędów merystematycznych i przybyszowych w zależności od rodzaju i stężenia cukru
Growth of auxillary and adventitious shoots depending on type and concentration of saccharide

Rodzaj i stężenie cukru; Kind and concentration of saccharide	LR ⁶⁾ (szt.; pcs)	LD (szt.; pcs)	LP (szt.; pcs)	LDD (mm)	LPP (1–5)	WPP (1–5)
FR ⁴⁾ 16 g·dm ⁻³ (0,089 mol·dm ⁻³)	5,0 abc ⁵⁾	5,9 c	10,9 c	137 c	2,9 de	2,6 c
FR 30 g·dm ⁻³ (0,167 mol·dm ⁻³)	4,7 ab	4,0 b	8,8 b	105 bc	2,5 bcd	2,7 c
GL 16 g·dm ⁻³ (0,089 mol·dm ⁻³)	5,2 bc	4,6 bc	9,7 bc	104 bc	3,1 c	2,3 b
GL 30 g·dm ⁻³ (0,167 mol·dm ⁻³)	4,9 abc	3,2 b	8,1 b	67 b	2,4 abc	2,4 bc
SO 16 g·dm ⁻³ (0,088 mol·dm ⁻³)	5,0 abc	1,1 a	6,1 a	20 a	2,1 ab	1,9 a
SO 30 g·dm ⁻³ (0,165 mol·dm ⁻³)	4,5 a	0,5 a	5,0 a	9 a	2,1 a	1,9 a
K ⁵⁾ : SA 30 g·dm ⁻³ (0,088 mol·dm ⁻³)	5,3 c	3,9 b	9,2 bc	88 b	2,7 cd	2,4 bc

- 4) – FR – fruktoza; fructose, GL – glukoza; glucose, SO – sorbitol; sorbitol, SA – sacharoza; sucrose
- 5) – oznaczenia skrótów jak w tabeli 1; explanation of abbreviations see Table 1

Tabela 3; Table 3

Wzrost pędów merystematycznych i przybyszowych na pożywce stałej i dwufazowej
Growth of auxillary and adventitious shoots on solid and double-phase medium

Rodzaj pożywki Kind of medium	MK ⁷⁾ (mg)	LR ⁸⁾ (szt.; pcs)	LD (szt.; pcs)	LP (szt.; pcs)	LPP (1-5)	WPP (1-5)
K ⁹⁾ : stała; solid	280,2 a	2,0 a	4,4 a	6,4 a	2,4 a	2,7 a
Dwufazowa; Double phase	518,2 b	3,0 b	9,3 b	12,4 b	2,8 a	3,2 b

⁷⁾ – świeża masa kultur; fresh weight of culture

^{8,9)} – oznaczenia skrótów jak w tabeli 1; explanation of abbreviations sec Table 1

zdolności liści do tworzenia pędów przybyszowych, wzrost zaś pędów przybyszowych był najniższy przy dwóch skrajnych stężeniach tego cukru (tab. 1). Najlepszą proliferację i elongację pędów pachowych zaobserwowano u kultur rosnących na pożywce z dodatkiem glukozy i fruktozy podanych w niższych stężeniach wagowych (16,0 g·dm⁻³), tab. 2. W warunkach tych najintensywniejsze było także powstawanie pędów przybyszowych z liści, natomiast siła ich wzrostu porównywalna do kontroli. Zastosowanie cukrów prostych w wyższych koncentracjach oraz sacharozy (30 g·dm⁻³) przyniosło gorszy efekt w postaci osłabienia proliferacji pędów kątowych (cukry proste) lub ich elongacji (sacharoza). Wzrost kultur był zdecydowanie najniższy w obecności sorbitolu (tab. 2). Pożywka dwufazowa silnie pobudzała wzrost kultur pędów kątowych i przybyszowych w porównaniu do kontroli (pożywki stałej), tab. 3. Nie stwierdzono natomiast wyraźnego związku między rodzajem pożywki a intensywnością powstawania pędów przybyszowych. W prezentowanych doświadczeniach nie udało się przełamać ścisłego, dodatniego związku między wzrostem pędów kątowych i przybyszowych. Każda modyfikacja pożywki, która stymulowała wzrost pędów kątowych, pobudzała jednocześnie wzrost pędów przybyszowych oraz przeważnie intensywność ich powstawania. Na uwagę zasługuje fakt upóźdzonego powstawania pędów przybyszowych na pożywkach z wyższym, molarnym stężeniem cukru. Być może warto byłoby sprawdzić reakcje kultur na osmotyczność pożywki, stężenie mannitolu itp. Według niektórych autorów, m.in. [De KLERK 1990] z pędów przybyszowych, znacznie częściej niż z kątowych, powstają rośliny nietypowe, tzw. off-type. Na obecnym etapie badań, kiedy brak jest informacji, czy rośliny borówki otrzymane z pędów przybyszowych zachowują cechy odmianowe, klonowanie z ich wykorzystaniem należy uznać za niewskazane. Niewątpliwie zmniejsza to wydajność kultur, zwiększa zaś pracochłonność i koszty mikrorozmnażania borówki wysokiej. W hodowli twórczej, gdzie rozszerzenie zakresu zmienności materiału wyjściowego jest pożądane, lub np. w technikach transformacji wykorzystujących pędy przybyszowe, w wypadku borówki wysokiej można polecić stosowanie glukozy i fruktozy w stężeniu 16,0 g·dm⁻³ lub sacharozy w koncentracji 10–20 g·dm⁻³, które sprzyjały intensywnemu powstawaniu takich pędów.

Wnioski

1. Wzrost pędów kątowych i przybyszowych borówki wysokiej był najsilniejszy na pożywce z dodatkiem glukozy i fruktozy w stężeniu (16,0 g·dm⁻³).
2. Zwiększanie koncentracji sacharozy w pożywce z 10 do 60 g·dm⁻³ powodowało stopniowe zmniejszanie intensywności powstawania pędów przybyszowych na liściach.

3. Pożywka dwufazowa silniej niż stała pobudzała wzrost pędów kątowych i przybyszowych.

Literatura

DE KLERK G.J. 1990. *How to measure somaclonal variation*. Act. Bot. Neerl. 39(2): 129–144.

LITWIŃCZUK W. 2000. *Efficiency of a double-phase medium in micropropagation of semi-dwarf apple rootstocks M.26, MM.106 and P.14*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research VIII, 3–4: 97–106.

ZIMMERMAN R.H., BROOME O.C. 1980 *Blueberry micropropagation*. USDA-SEA., Agr. Res. Results ARR-NE, 11: 44–47

Słowa kluczowe: borówka, cukry, kultury *in vitro*, pędy kątowe, pędy przybyszowe, pożywka dwufazowa

Streszczenie

Celem doświadczeń było stwierdzenie, który z testowanych cukrów: sacharoza (10–60 g·dm⁻³), glukoza (16 i 30 g·dm⁻³), fruktoza (16 i 30 g·dm⁻³), sorbitol (16 i 30 g·dm⁻³) sprzyja najbardziej wydajnemu mikrozmnażaniu pędów borówki wysokiej (*Vaccinium × corymbosum* L.) odmiany 'Herbert'. Badano też przydatność pożywki dwufazowej. Najlepszą proliferację i elongację pędów kątowych zaobserwowano u kultur rosnących na pożywce z dodatkiem glukozy i fruktozy podanych w stężeniu (16,0 g·dm⁻³). W warunkach tych najintensywniejsze było także powstawanie pędów przybyszowych z liści. Zwiększanie koncentracji sacharozy z 10 do 60 g·dm⁻³ powodowało stopniowe zmniejszanie zdolności liści do wydania pędów przybyszowych. Pożywka dwufazowa silniej pobudzała wzrost kultur kątowych i przybyszowych w porównaniu do pożywki stałej. Nie stwierdzono natomiast wyraźnego związku między rodzajem pożywki a intensywnością powstawania pędów przybyszowych.

GROWTH OF Highbush BLUEBERRY (*Vaccinium × corymbosum* L.) *in vitro* DEPENDING ON THE KIND AND CONCENTRATION OF SACCHARIDES AND ADDITION OF LIQUID MEDIUM

Key words: blueberry, culture *in vitro*, adventitious shoots, auxillary shoots, double-phase medium, saccharides

Summary

The purpose of this study was to find out which saccharide: sucrose (10–60 g·dm⁻³), glucose (16 and 30 g·dm⁻³), fructose (16 and 30 g·dm⁻³), sorbitol

(16 and 30 g·dm⁻³) promotes the most efficient shoot multiplication in highbush blueberry (*Vaccinium × corymbosum* L.) cv. 'Herbert'. The usefulness of two-phase medium was also evaluated. The best proliferation and elongation of axillary shoots as well as the most intense initiation of adventitious shoots on leaves were observed in cultures grown on media supplemented with fructose (16 g·dm⁻³) and glucose (16 g·dm⁻³). Increasing sucrose concentration from 10 to 60 g·dm⁻³ reduced the leaf ability to formation of adventitious shoots. Double-phase medium stimulated the growth of axillary and adventitious shoots stronger than the solid one. However, no distinct relationship between kind of medium and intensity of adventitious shoots initiation was observed.

Dr Wojciech Litwińczuk
Katedra Produkcji Roślinnej
Uniwersytet Rzeszowski
ul. Ćwiklińskiej 2
35-601 RZESZÓW
e-mail: wlitw@univ.rzeszow.pl