

Braškių veislių atsparumo šalčiui nustatymas ir atranka *in vivo*

Vanda Lukoševičiūtė*¹, Rytis Rugienius²

¹Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodas. Ž. E. Žilibero g. 6, LT-46324 Kaunas

²Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės institutas

Kauno g. 30, Babtai, LT-54333 Kauno r.

Tel. +370 37 390033, el. paštas: ¹v.lukoseviciute70@gmail.com, ²r.rugienius@lsdi.lt

(Gauta 2014 m. sausio mėn.; atiduota spaudai 2014 m. balandžio mėn.; prieiga internete nuo 2014 m. gegužės 02 d.)

Anotacija

Straipsnyje aptariami augalų atrankos modeliavimo, kūrimo metodai siekiant augalus diferencijuoti pagal jų ištvermingumą žiemą. Siekiant iškelto tikslo buvo analizuota tiesioginė sąsaja augalų būklės, jų užsigrūdinimo lygio galimybės *in vivo*, esant atitinkamoms klimatinėms sąlygoms, tiriamuoju laikotarpiu. Straipsnyje pateikiama skirtingo atsparumo šalčiui braškių veislių užsigrūdinimo greičio svarba atrenkant, diferencijuojant augalus pagal šį požymį.

Reikšminiai žodžiai: atsparumas šalčiui, braškė, *in vivo*, užsigrūdinimas.

Abstract

The article discusses the modelling of plant selection and origination methods in order to differentiate plants according to their resistance in winter. For the purpose of research, a direct link between plant health and possibilities of their cold acclimation level *in vivo* in appropriate climatic conditions during the investigation period was analysed. In this article, the importance of cold acclimation speed of strawberry varieties with different cold hardiness in the selection and differentiation of plants in accordance with this feature is discussed.

Key words: cold hardiness, strawberry, *in vivo*, cold acclimation.

Įvadas

Pagrindiniai veiksniai, lemiantys augalų geografinį pasiskirstymą, turintys didžiulę įtaką kultūrinių augalų derlingumui yra jų atsparumas šalčiui ir ištvermingumas žiemą. Braškės užima svarbią vietą tarp uoginių augalų pasaulyje. Tačiau temperatūros svyravimai žiemojimo sąlygomis, nepakankama sniego danga turi didelės įtakos braškių pašalimui. Naujų ir adaptyvių, derlingų ir kokybiškų uogų braškių veislių sukūrimą ir introdukciją apsunkina nepakankamas šių augalų atsparumas šalčiui bei ištvermingumas žiemą.

Augalų savybė išverti žemas temperatūras nepatiriant didelių produktyvumo nuostolių laikoma – jų atsparumas žemoms temperatūroms. Augalų ištvermingumas žiemą, atsparumas šalčiui yra sudėtingi, daugiakomponenčiai požymiai, kurie labai priklauso nuo konkretaus genotipo. Užsigrūdinimo metu augalų jų reakcija į išorinius signalus apima morfologinius, fiziologinius, molekulinus, biocheminius pokyčius (Gilmour, Sebolt ir kt., 2000; Janska, Maršik ir kt., 2009). Atlikus biocheminius, fiziologinius genetinius, molekulinus tyrimus išaiškėjo šios problemos sudėtingumas (Zhu, Dong ir kt., 2007; Jan, Ul-Hussain ir kt., 2009; Sanghera, Wani ir kt., 2011). Yra teigiama, kad nėra vieningo atsparumo šalčiui mechanizmo, kuris būtų būdingas visiems augalams. Tačiau sprendžiant augalų adaptyvumo problemą, kiekvienas žingsnis į priekį yra reikšmingas. Viena iš prioritetinių krypčių, kuri svarbi ne tik moksliniuose tyrimuose, praktinėje selekcijoje – efektyvi genotipų diferencijavimo sistema pagal augalų atsparumą šalčiui. Svarbu rasti kriterijus, kuriuos panaudojus būtų galima sutrumpinti atrankos laikotarpį ir atrinkti ištvermingas žiemą augalų veisles.

Darbo tikslas – išskirti atrankos kriterijus nustatant sąlygas atspariems šalčiui braškių genotipams atrinkti *in vivo*.

Tyrimo metodika

Tyrimui buvo naudotos daržinės braškės (*Fragaria x ananassa* Duch) augalų dvi skirtingo atsparumo šalčiui veislės ‘Melody’ ir ‘Elsanta’. Tyrimai atlikti 2010–2011 metais Lietuvos

agrariųjų ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės instituto Sodo augalų genetikos ir biotechnologijos skyriuje. Eksperimentiniai tyrimai atlikti lauko selekciniam uogyne, klimato kameroje. Tyrimams panaudotų braškių veislių charakteristika pateikiama 1 lentelėje.

1 lentelė. Daržinės braškės augalų veislių charakteristika
Table 1. *Fragaria x ananassa* plant species characteristic

Veislė	Tėvinės formos	Sukūrimo metai, kilmės šalis	Ištvermingumas žiemai	Literatūros šaltinis
‘Elsanta’	‘Gorella’ x ‘Holiday’	1975, Olandija	Neištverminga žiemai	Rugienius, Sasnauskas, 2005
‘Melody’	SCRI 66 M1 x ‘Senga Sengana’	1991, Didžioji Britanija	Ištverminga žiemai	Rugienius, 2000

Šaldymo tyrimams atlikti panaudota braškių augalų, *in vivo*, 1 cm skersmens lapų diskai. Šaldyta nuo -5 iki -14 °C temperatūros „Persival LT-36VL“ kameroje 2 h -2 °C, po to temperatūra sumažinta 1 °C h⁻¹ greičiu. Šaldymo metu žemiausioje temperatūroje laikyta 1 h, 12 h. Po šaldymo lapų diskai 10 ml dejonizuotame vandenyje inkubuoti 4 °C temperatūroje 24 h, esant 8/16 h diena / naktis fotoperiodui. Lapų audinių būklė įvertinta konduktometriju metodu, matuojant jonų išlaisvinimą. Po autoklavavimo įvertintas bendras jonų kiekis matuojant tirpalo elektrinį laidumą, o jonų išlaisvinimo procentinis santykis nustatytas nešaldytų ir maksimaliai sušaldytų (6 h, -20 °C) bandinių atžvilgiu. Santykinis jonų išlaisvinimas temperatūroje – T :
$$SJI_T = \frac{JI_T}{EL_{AUTOKL}} \cdot 100\%$$

čia JI_T – bandinio jonų išlaisvinimas palaikius temperatūroje T ; EL_{AUTOKL} – bandinio jonų išlaisvinimas po autoklavavimo 120 °C temperatūroje 20 minučių. Pažeidimo indeksas temperatūroje – T :
$$IT = \frac{SJI_T - SJI_{KONTR}}{100 - SJI_{KONTR}} \cdot 100\%$$

čia SJI_{KONTR} – santykinis jonų išlaisvinimas kontroliniuose (nešaldytuose) bandiniuose. Normalizuotas pažeidimas temperatūroje – T :
$$I_T = \frac{IT}{I_{-20}} \cdot 100\%$$

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

Apskaičiuojant jonų išlaisvinimą, kuris atitinka 50 % augalų žuvimą, po šaldymo, praėjus 30 parų buvo vizualiai nustatytas augalų pažeidimo laipsnis, balais ir išgyvenusių / žuvusių augalų kiekis, procentais (Lukoševičiūtė, Staniėnė ir kt., 2011).

Kritiniu jonų išlaisvinimu (KJI), atitinkančiu 50 % augalų žuvimą, yra priimta laikyti aritmetinį vidurkį tarp jonų išlaisvinimo šaldant temperatūroje, kurioje visi šaldyti augalai yra žuvę, ir jonų išlaisvinimo šaldant temperatūroje, kur augalų žuvimas neužfiksuotas (Rajashekar, Westwood ir kt., 1982; Sutinen, Palta ir kt., 1992).

Atlikus tyrimus nustatytas kritinis jonų išlaisvinimas siekė 65 %. Temperatūrų intervalas, kuriame 0 ir 100 %, augalų žuvimas siekė -5 – -14 °C. Kritinė temperatūra (KT_{50}), kurioje jonų išsilaisvinimas atitinka 50 % augalų žuvimą, buvo apskaičiuotas pagal KJI. KT_{50} apskaičiuotas naudojant tiesinę regresiją ($\bar{y} = a + b\bar{x}$),

$$\text{čia } a = \bar{y} - b\bar{x}, b = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2}, \text{ kur } \bar{x} - \text{žinomas jonų išlaisvinimas } \%$$

čia \bar{y} – žinoma temperatūra; x ir y – imties vidurkiai. Pateiktas 10 pakartojimų vidurkis ir standartinė vidurkio paklaida.

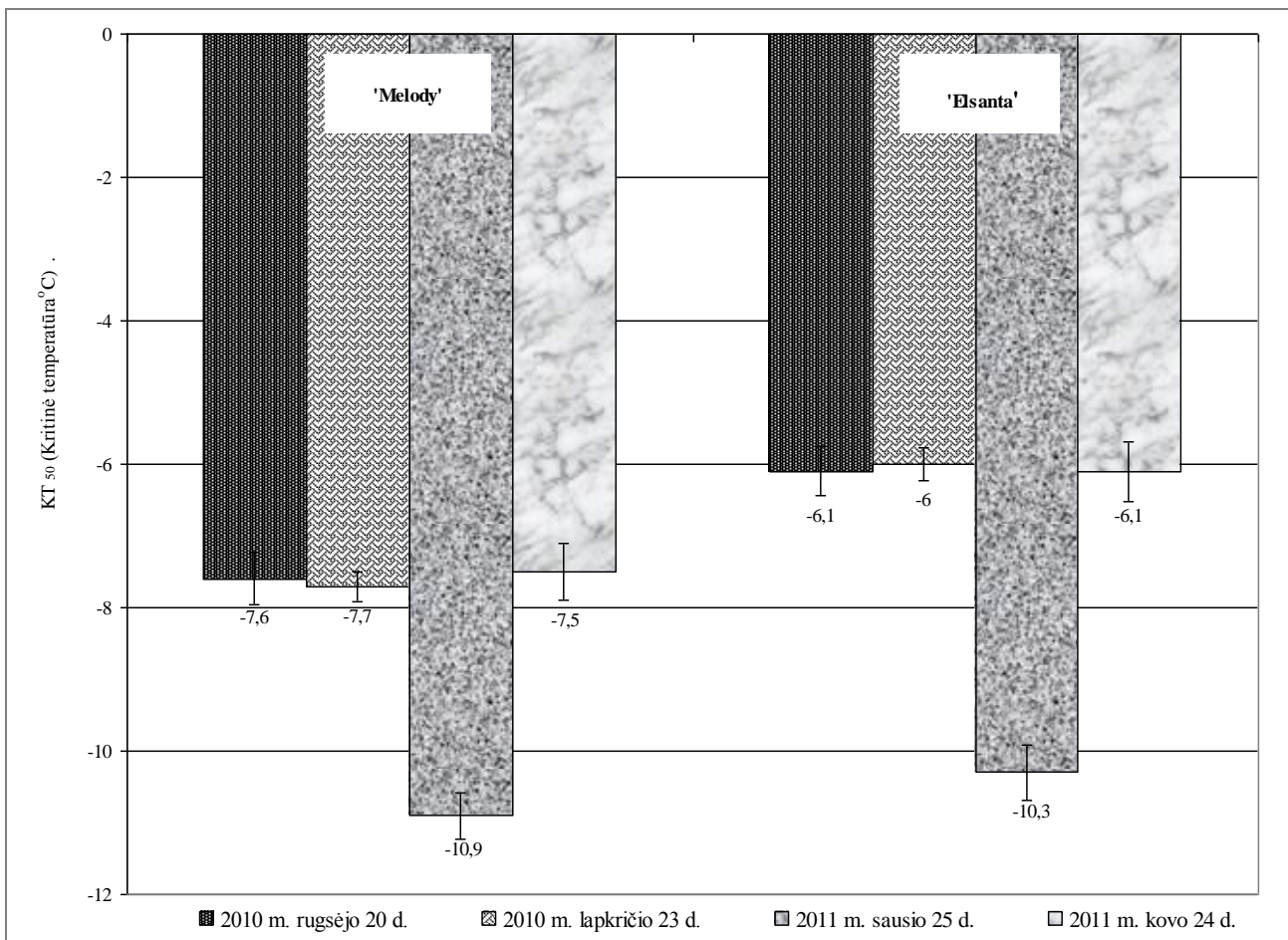
Tyrimo duomenų statistinė analizė atlikta panaudojant programinius paketus MS Excel ir Statistica 7.0. Rezultatuose pateikiami matavimų vidurkiai, standartinės vidurkio paklaidos. Vienfaktorinės dispersinės analizės metodu panaudojant kompiuterinę programą ANOVA įvertintas duomenų patikimumas (Tarakanovas,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

Rezultatai ir jų aptarimas

Selekcijos proceso metu sukuriama daug selekcinės medžiagos, įvairių augalų genotipų derinių. Dėl besikeičiančių, nepastovių klimatinių sąlygų vidutinio klimato juostoje, norint patikimai įvertinti augalų ištvermingumą žiemą būtini daugiamečiai stebėjimai bei tyrimai. Modeliuojami ir kuriami augalų atrankos metodai siekiant diferencijuoti augalus pagal atsparumą šalčiui, sutrumpinti selekcijos proceso trukmę bei sumažinant sąnaudas, kurios siekia nemažus kaštus.

Braškių, augintų lauke, *in vivo*, atsparumas šalčiui priklauso nuo augalų užsigrūdinimo, konkrečių metų oro klimatinių sąlygų. Nustatyta, kad svarbią reikšmę braškių atsparumui šalčiui, šaldant jas kontroliuojamomis sąlygomis, turi šaldymo temperatūra ir šaldymo laikas. Todėl labai svarbu parinkti tokį šaldymo laiką, kada skirtumai tarp braškių veislių pagal augalų atsparumą šalčiui išryškėtų labiausiai.

Siekiant nustatyti natūraliai užsigrūdinusių braškių, *in vivo*, atsparumą šalčiui, augalų lapai buvo šaldomi keturiais skirtingais laikotarpiais: 2010 m. – rugsėjo ir lapkričio mėnesiais, 2011 m. – sausio ir kovo mėnesiais. Šaldymo eksperimentų rezultatai parodė, kad braškės yra atspariausios šalčiui, šaldant jas sausio mėnesį (1 pav.). Šaldant natūraliai užsigrūdinusių braškių lapus šaldymo laikas lėmė užsigrūdinimo lygį, taip pat ramybės periodo gilumą. Nuo minėtų veiksnių priklausė augalų atsparumas šalčiui, esant skirtingai šaldymo temperatūrai.



1 pav. Natūraliai užsigrūdinusių braškių kritinės temperatūros įvertinimas po šaldymo augalų lapų diskų klimato kameroje *in vivo*

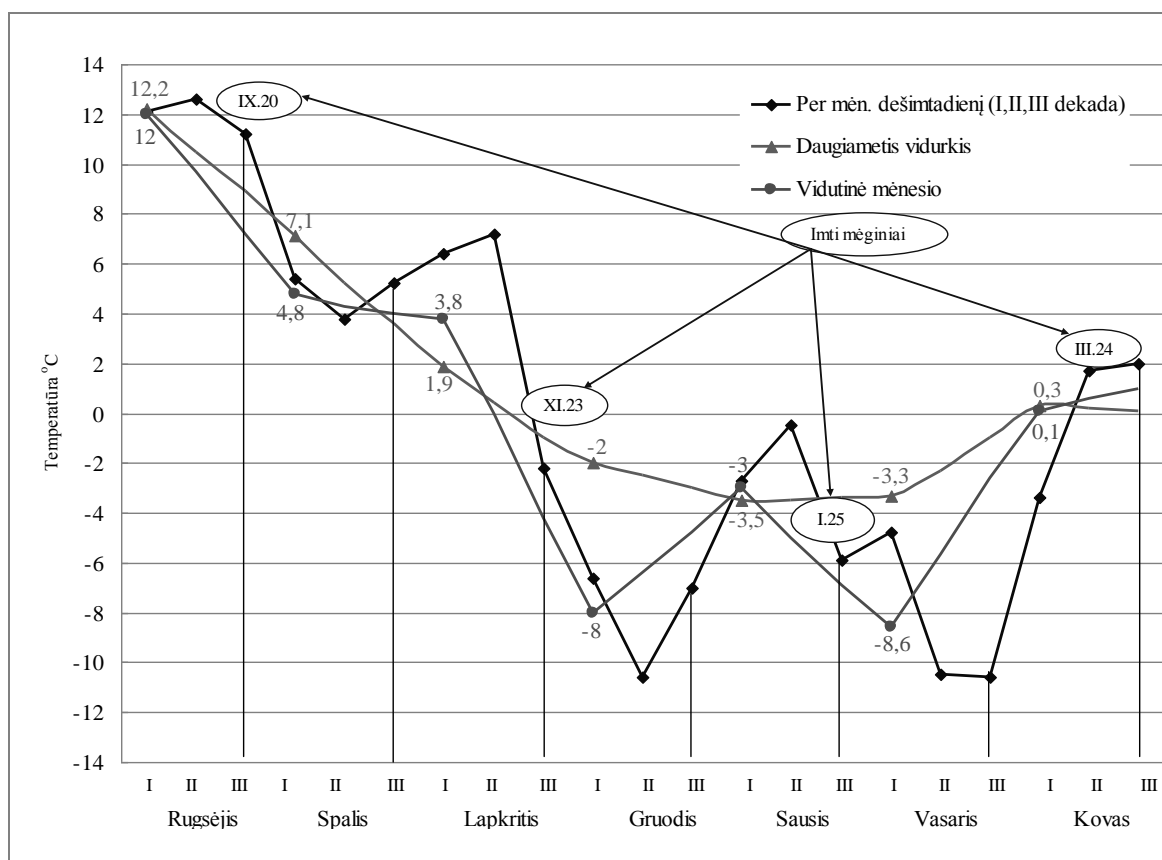
Fig. 1. The critical temperature of naturally cold acclimated strawberries during chilling of the leaf discs of plants under climate camera *in vivo*

Tiriamuoju laikotarpiu apskaičiuota braškių kritinė temperatūra KT_{50} buvo žemiausia sausio mėnesį. Tačiau skirtumai tarp braškių veislių maksimaliai išryškėjo šaldant augalų lapų diskus lapkričio mėnesį, kai neištvermingos žiemą veislės ‘Elsanta’ augalai dar buvo nespėję užsigrūdinti. Tai rodo, kad genotipų diferenciacijai pagal atsparumą šalčiui svarbu ne tiek temperatūros minimumas, kiek užsigrūdinimo lygis, kurį lemia skirtinga reakcija į temperatūros pokyčius vegetacijos pabaigoje.

Braškių lapų diskų šaldymo tyrimų rezultatai atskleidė, kad užsigrūdinusiuose augaluose yra mažesni šalčio sukelti pažeidimai ir didesnis braškių išgyvenamumas *in vivo*. Neištvermingos žiemai braškių veislės ‘Elsanta’ absoliuti reikšmė KT_{50} padidėjo 0,6–1,7 °C lyginant su ištvermingos veislės ‘Melody’.

Abiejų tirtų braškių veislių žemiausia kritinė temperatūra nustatyta šaldant augalus sausio mėnesį – ji siekė -10,3 – -10,9 °C. Tai rodo, kad sausio mėnesį braškės buvo atspariausios šalčiui. Rezultatai atitinka daugiamečių stebėjimų išvadas, kad braškės kaip ir kiti žiemojantys augalai, maksimalų užsigrūdinimą ir atsparumą šalčiui pasiekia sausio mėnesį (Чиркова, 2002; Кичина, 2006). Vėliau, jau esant priverstinės ramybės būsenoje, ar esant nepastoviai temperatūrai, braškių atsparumas šalčiui vėl gali sumažėti. Šaldant rugsėjo, lapkričio, kovo mėnesiais, braškių kritinė temperatūra buvo žymiai aukštesnė ir svyravo nuo -6 iki -7,7 °C. Šio svyravimo priežastingumas siejamas su veislės ištvermingumu žiemą ir šaldymo laiku. Tai rodo, kad iki lapkričio mėnesio 23 dienos braškės dar nebuvo maksimaliai užsigrūdinusios, o kovo mėnesio 24 dieną užsigrūdinimas jau buvo iš dalies prarastas. Mūsų rezultatai sutampa su atliktais tyrimais L. Linden, P. Palonen su bendraautorais (2002), kurie šaldė braškes sausio, kovo ir balandžio mėnesiais, o didžiausią diferenciaciją pagal atsparumą šalčiui gavo šaldydami augalus sausio mėnesį.

Analizuojant 2010–2011 metų klimatinės oro sąlygas nustatyta, kad vidutinė mėnesio oro temperatūra rugsėjį buvo 12 °C (2 pav.).



2 pav. Vidutinė paros oro temperatūra, tiriamuoju laikotarpiu, 2010 – 2011 metais

Fig. 2. The average daily temperature in the period of 2010 – 2011

Spalio–lapkričio mėnesį oro temperatūra žemėjo netolygiai, su pakilimu lapkričio antrąjį dešimtadienį nuo 4 °C iki 7 °C ir po to tolygesniu temperatūros žemėjimu iki pat gruodžio antros dekados, kai temperatūra pasiekė minimumą. Nuo tada ir beveik iki kovo mėnesio antros dekados temperatūra nepakilo aukščiau 0 °C.

Braškių lapų diskų šaldymo eksperimentų tyrimai parodė, kad natūraliai, *in vivo*, užsigrūdinusios braškės yra atspariausios šalčiui šaldant jas sausio mėnesį – jų kritinė temperatūra tuomet buvo žemiausia. Tyrimo rezultatai tikėtini, nes sausio mėnesį braškių augalai pakankamai užsigrūdinę, yra organinės ramybės fazės. Visgi, genotipų diferenciacijos požiūriu, geriau šaldyti braškių augalus lapkričio mėnesio laikotarpiu, kuomet skirtumai tarp veislių yra didžiausi. Matyt, taip yra dėl to, kad neištvermingos žiemą braškių veislės ‘Elsanta’ augalai tuo metu buvo nepakankamai užsigrūdinę arba žymiai mažiau užsigrūdinę negu ištvermingos žiemą ‘Melody’ veislės augalai. Čia galima daryti prielaidą, kad skirtingų genotipų diferenciacijai pagal atsparumą šalčiui svarbu ne minimalios šaldymo temperatūros, o užsigrūdinimas. Matome, kad skirtingos braškių veislės užsigrūdinimo metu nevienodai reaguoja į temperatūros pokyčius.

Braškių, augintų natūraliomis sąlygomis lauke, *in vivo*, augalų lapų šaldymo skirtingais laikotarpiais rezultatai, parodė skirtumus tarp atskirų braškių veislių augalų atsparumo šalčiui, kuriuos daugiau lemia užsigrūdinimo greitis (pradžia) ir jo tvarumas, negu augalų sugebėjimas išgyventi esant maksimaliam užsigrūdinimui bei veikiant žemoms neigiamoms temperatūroms (1 pav.). ‘Melody’ ir ‘Elsanta’ tirtų braškių veislių augalų kritinė temperatūra buvo žemiausia šaldant sausio mėnesį. Tai reiškia, kad žiemos viduryje braškės pasiekia maksimalų užsigrūdinimą ir yra atspariausios šalčiui. Tai tik patvirtina daugiamečių stebėjimų duomenis autorių R. Rugienius (2000); R. Rugienius, A. Sasnausko (2005); P. Fisher (2004); N. Jan, M. Ul-Hussain su bendraautorais (2009) apie augalų atsparumą šalčiui bei ištvermingumą žiemą. Manoma, kad skirtingas atsparumas šalčiui labiau susijęs su skirtinga augalų reakcija į temperatūros pokyčius, o ne į patį šaltį.

Išvados

1. Braškių lapų šaldymo *in vivo* rezultatai parodė, kad skirtumus tarp atskirų braškių veislių augalų atsparumo šalčiui daugiau lemia užsigrūdinimo greitis (pradžia) ir jo tvarumas.
2. Tinkamiausias šaldymo sąlygų kompleksas braškių genotipams diferencijuoti *in vivo*, remiantis braškių augalų užsigrūdinimo ir atsparumo šalčiui tyrimo rezultatais nustatytos – natūraliai užsigrūdinusių augalų šaldymas kontroliuojamomis sąlygomis lapkričio mėnesį, esant -10 – -12 °C šaldymo temperatūrai.
3. Remiantis braškių šaldymo *in vivo* rezultatais nustatyta, kad grūdinimas mažina šalčio sukeltus pažeidimus ir didina augalų išgyvenamumą. Atsparios šalčiui veislės ‘Melody’ augalų KT_{50} absoliuti reikšmė, palyginti su neatsparios šalčiui veislės ‘Elsanta’ padidėjo 0,6–1,7 °C.

Literatūra

1. 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.
2. Fisher P. Cold acclimation in strawberries: How strawberry plants get ready for winter. 2004. [interactive]. Internet link: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/hort/news/hortmatt/2004/28hrt04a6.htm>.
3. Jan N., Ul-Hussain M. and Andrabi K.I. Cold resistance in plants: A mystery unresolved. *Electron Journal of Biotechnology*, 12(3), 2009. P. 1–15.
4. Janska A., Maršik P., Zelenkova S. & Ovesna J. Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology*, 12, 2009. P. 395–405.

- 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.
- Lukoševičiūtė V., Stanienė 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.
- Rajashekar C., Westwood M.N., Burke M.J. Deep supercooling and cold hardiness in genus *Pyrus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107, 1982. P. 968–972.
- Rugienius R. Atsparių šalčiui braškių sėjinių atrankos technologijų *in vitro*, *in vivo* ir *in situ* palyginimas. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 19(2), Baltai, 2000. P. 3–10.
- Rugienius R., Sasnauskas A. Braškių veislių ir hibridinių klonų tyrimas. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 24(1), Baltai, 2005. P. 34–41.
- Sanghera G. S., Wani S. H., Hussain W. and Singh N. B. Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants. *Current Genomics*, 12(1), 2011. P. 30–43.
- Sutinen M.–L., Palta J.P., Reich P.B. Seasonal differences in freezing stress resistance of needles of *Pinus nigra* and *Pinus resinosa*: evaluation of the electrolyte leakage method. *Tree Physiology*, 11, 1992. P. 241–54.
- Tarakanovas P., Raudonius S. *Agronominių tyrimų duomenų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, SPILT-PLOT iš paketo SELEKCIJA ir IRRISTAT*. Akademija, 2003.
- Zhu J., Dong C. H., Zhu J. K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*. 10(3). 2007. P. 290–295.
- Кичина В.В. Природа зимостойкости концепция и практическая селекция. *Плодоводство и ягодоводство России*: Сб. науч. тр. ВСТИСП. М., XVI, 2006. С. 18–33.
- Чиркова Т.В. *Физиологические основы устойчивости растений*. СПб. Изд. С. Петербургского университета, 2002. С. 1–240.

Cold Hardiness Identification and Selection of Strawberry Varieties *In Vivo*

(Received in January, 2014; Accepted in April, 2014; Available Online from 2nd of May, 2014)

Summary

The cold hardiness of naturally cold acclimated strawberry *in vivo* was investigated at the department of Orchard Plant Genetics and Biotechnology of IH LRCAF. In the study, two varieties of strawberries characterized with different cold hardiness – resistant in winter ‘Melody’ and susceptible in winter ‘Elsanta’ were used. In order to evaluate more precisely and objectively the injury of plants by cold, a conductivity method of measuring ion discharge after freezing was used in the study. Conductivity method is suitable to differentiate the different genotypes according to plant cold hardiness and to calculate a critical temperature at which 50% of plants will survive.

The results of the investigation have confirmed that strawberry variety ‘Melody’ plants are more resistant in winter than variety ‘Elsanta’ plants. Reliable differences between these varieties were received in the chilling of plants in September, November and January. The results of different periods' freezing of strawberry leaves cultivated in natural conditions in a field (*in vivo*) indicate that differences of cold hardiness of plants between individual strawberry varieties are more determined by cold acclimation speed (onset) and its stability, rather than by the ability to survive in the given maximum cold acclimation and low negative temperatures.

Analysis of strawberry plant leaves' freezing has shown that acclimation reduces injuries caused by cold and increases strawberry survival *in vivo*. The KT_{50} absolute value of resistant in winter strawberry variety 'Melody' in comparison with susceptible 'Elsanta' has increased by 0.6 – 1.7 °C. It was found that the critical lowest temperature for both investigated strawberry plant varieties was lowest when chilled in January -10.3 – -10.9 °C. This indicates that strawberries in the middle of winter reach the maximum cold acclimation and are the most resistant to cold. This is confirmed by the long-term observation data on plant cold hardiness. However, the differences between different resistances in winter varieties' have maximally shown up when leaf discs of plants were chilled in November, when susceptible varieties ‘Elsanta’ plants were still not cold acclimated. This shows that for the differentiation of genotypes according to the cold hardiness more important is the cold acclimation level, which is determined by different reaction to the temperature changes at the end of vegetation, rather than a temperature minimum.