

PAZEMINĀTAS TEMPERATŪRAS IETEKME UZ HIBRĪDAPŠU IN VITRO APSAKŅOŠANOS UN AUGŠANU

I.Dubova, LVMI "Silava"

Kopsavilkums: vairāku hibrīdapšu (*P.tremuloides* x *P.tremula*) un triploīdu (*P.tremula*) klonu dzinumu kultūras tika sekmīgi uzglabātas 1-6 mēnešus pazeminātā temperatūrā (4-5° C) un minimālā apgaismojumā multiplikācijas barotnē. Uzglabāšanas laikā vērtēta dzinumu un lapu dzeltēšana un nekroze, dzinumu apsākšanās spēja, turpmākā kultūru augšana un attīstība. Konstatēts, ka 2-4 mēnešu laikā atmirst *in vitro* kultūru lapas, bet dzinumi saglabā vitalitāti vairāk nekā gadu.

Pēc 3 mēnešiem apsākšanās procesam nepieciešamais laiks pagarinās no 10 līdz 20 dienām: vidēji apsāktojas tikai 40-50% dzinumu. Pēc pārstādīšanas svaigā pavairošanas barotnē sekmīgi atjaunojas kultūru augšana. Pirmajā subkulturā salīdzinājumā ar kontroli konstatēts pazemināts multiplikācijas koeficients.

Nozīmīgākie vārdi: hibrīdapse, *in vitro*, uzglabāšana.

I.Dubova, LFRI „Silava”. Effect of *in vitro* cold storage on survival and rooting of hybrid aspen shoot cultures

Abstract: Shoot cultures of some hybrid aspen (*Populus tremuloides* x *P.tremula*) and aspen triploids (*P.tremula*) clones were successfully stored *in vitro* on multiplication medium at 4-5°C. The rooting capacity, survival and necrosis of leaves and shoots, multiplication rate were evaluated after storage during 1-6 months under light conditions. The leaves from cultures became progressively yellow and necrotic during 2-4 months of cold storage, the shoots of the cultures survived 100% at the end of the trials after 1 year storage.

The rooting of shoots produced from cold storage cultures after 3 months was only 40-50% and time of successful rooting increased from 10 to 20 days. Cold storage reduced proliferation rate in the first subculture under standard growth room conditions.

Key words: hybrid aspen, *in vitro*, cold storage.

И.Дубова, ЛГИЛН «Силава». Влияние пониженной температуры на рост и укоренение клонов гибридной осины *ин vitro*

В статье обобщены результаты исследований роста, развития и укоренения клонов гибридной и триплоидной осин размноженных методом *ин vitro* после длительного (1 до 6 месяцев) хранения культур клонов в температуре 4-5 °C.

Установлено, что в течение 2-4 месяцев полностью некротизируются листья, но почки и черенки сохраняют витальность до года. После 3 месяцев в условиях пониженной температуры увеличивается период укоренения микрочеренков от 10 до 20 дней, укореняемость снижается до 40-50%.

Ключевые слова: гибридная осина, *in vitro*, хранение в пониженной температуре.

Ievads

Audu kultūru materiāla uzglabāšanai pazeminātā temperatūrā ir dažādas pielietošanas iespējas: vairāku mēnešu ilga apstrāde 0-10°C var simulēt miera periodu, kas nepieciešams daudzu augu normālai attīstībai; pazemināta temperatūra palēnina augu augšanu, tādējādi masveida ražošanā samazinot darba laika patēriņu augu pārstādīšanai. Genotipu bankas veidošanai un *in vitro* kultūru ilgstošai uzglabāšanai izmanto kriosaglabāšanu - saldēšanu -196°C šķidrā slāpekļī, kas ir tehnoloģiski sarežģīta un dārga, toties ļauj saglabāt materiālu neierobežoti ilgi.

Pazemināta temperatūra ir viens no faktoriem, kas augiem izraisa stresu. Augu atbildes reakciju uz stresora iedarbību būtiski ietekmē kā genoms, tā arī dažādas fizioloģiski aktīvas vielas, kas regulē gēnu ekspresiju un jaunu olbaltumvielu sintēzi, kurām pie pazeminātas temperatūras ir aizsargloma (Renaut, 2001). Atbildes reakcija izpaužas adaptīvi fizioloģisku, morfoloģisku un bioķīmisku izmaiņu veidā – tiek kavēta augšana, notiek izmaiņas oglekļa metabolismā un proteīnu sintēzes mehānismā. Būtisks pieaugums novērots hlorofila fluorescences parametros, ko iespējams izmantot kā fizioloģisku stresa marķieri (Kevers, 2004).

Augu taksonu banku *in vitro* iespējams 1-3 gadus uzglabāt 0-10°C temperatūrā, izmantojot būtiski atšķirīgu barotņu receptūru, kas ietver inhibitoru tipa vielas (fenoli, abscizskābe). Nozīmīga loma ir paaugstinātam (līdz 6%) cukuru sastāvam barotnē, kas nodrošina papildus enerģijas devu (Kļaviņa, 2001).

Apšu un papeļu, arī hibrīdapšu, pavairošana audu kultūrās grūtības nerada (Ahuja, 1984; Douglas, 1989; Chalupa, 1987), bet samērā maz informācijas ir par kokaugu audu kultūru uzglabāšanu pazeminātā temperatūrā (Hausman, 1994; Romano, 1999; Pruski, 2000). Praktiskai izmantošanai svarīgi noskaidrot, kā augi pēc uzglabāšanas perioda spēj atjaunot normālu augšanu, multiplikāciju un apsākņošanos. Hibrīdapšu audu kultūrās pēc 3 mēnešu uzglabāšanas 4°C temperatūrā novērota lapu nomelnēšana un nekroze, bet pēc 2 nedēļu ekspozīcijas 24°C temperatūrā un viena pārstādīšanas cikla (MS barotnē ar pievienotu 2iP 0,8 mg/l) kultūru augšana atjaunojas sākotnējā līmenī (Hausman, 1994). Jāatzīmē, ka uzglabāšana tumsā nodrošina labākus rezultātus nekā minimāls apgaismojums - tumsa veicina sakņu veidošanos pēc pārstādīšanas pavairošanas barotnē, arī

multiplikācijas koeficients nākamajā subkultūrā pēc 3 mēnešu aukstuma perioda tumsā ir lielāks nekā kontrolei. Barotņu sastāvam nav būtiskas nozīmes; optimālais kultivēšanas laiks pirms novietošanas aukstumkamerā ir 7-14 dienas (Hausman, 1994). Ozola *Q.suber* dzinumu kultūras pēc uzglabāšanas gaismā 5°C temperatūrā atmirušas pēc 6 mēnešiem, savukārt tumsā - pēc 2 gadiem saglabājušies dzīvi 50% dzinumu (Romano, 1999). Multiplikācijas koeficients ozolam pēc uzglabāšanas tumsā bijis līdzīgs kā kontrolei, bet dzinumi garāki - šāds efekts saglabājies 3 subkultūru laikā. Autori iesaka izmantot vismaz 3 audzēšanas ciklus, lai izvērtētu uzglabāšanas turpmāko ietekmi uz kultūru attīstību. Ozola dzinumu apsākšanās potenci uzglabāšana pazeminātā temperatūrā nav ietekmējusi. Kultūru reģenerācijas spēja vienas subkultūras laikā pēc 6, 12 vai 24 mēnešu uzglabāšanas tumsā nav būtiski atšķirusies. Lapu dzeltēšana un nekroze uzglabāšanas periodā daudz izteiktāka ir gaismā nekā tumsā: vispirms atmirst augšējās lapas, tad dzinumi (Romano, 1999). Visos gadījumos apsākotie dzinumi izstādīti un sekmīgi aklimatizēti *ex vitro*. Vairākām sugām, piemēram, kivi, barotnē nepieciešama citokinīnu klātbūtne, kas nosaka to izdzīvošanu aukstumperioda laikā; ābeļu pundurpotcelmu izdzīvošanu uzglabāšanas laikā nosaka BAP koncentrācija barotnē (Orlikowska, 1992); paaugstināta saharozes koncentrācija nepieciešama lakstaugiem, īpaši kartupeļiem. Ieteiktais optimālais kokaugu *in vitro* kultūru uzglabāšanas laiks - ne ilgāks par 3 mēnešiem (Pruski, 2000).

Metodika

Pētījumā izmantoti hibrīdapses un parastās apses triploīdu kloni no laboratorijā *in vitro* izveidotās apšu klonu kolekcijas, kas tiek uzturēta *in vitro*, izmantojot pamatbarotni – ½ MS ar BAP 0,1 mg/l, ISS 0,01 mg/l; pavairošanas (multiplikācijas) barotne 1/2MS ar palielinātu BAP koncentrāciju - 0,2mg/l - un 20 g saharozi. Kultūras tiek audzētas telpā 22-25 °C temperatūrā, apgaismojumā (luminiscentās lampas, 16 stundu fotoperiods). Audzēšanai izmantoti 300 ml tilpuma stikla trauki (barotnes daudzums ap 30 ml); no kultūras atdalītus dzinumus pārstāda svaigā barotnē ik pēc 4 nedēļu audzēšanas perioda (subkultūras). Pirms pārvietošanas uz aukstumkameru (4-5,5° C temperatūrā un minimālā apgaismojumā) audzēšanas trauku vāki, lai novērstu izžūšanu, tika hermetizēti ar

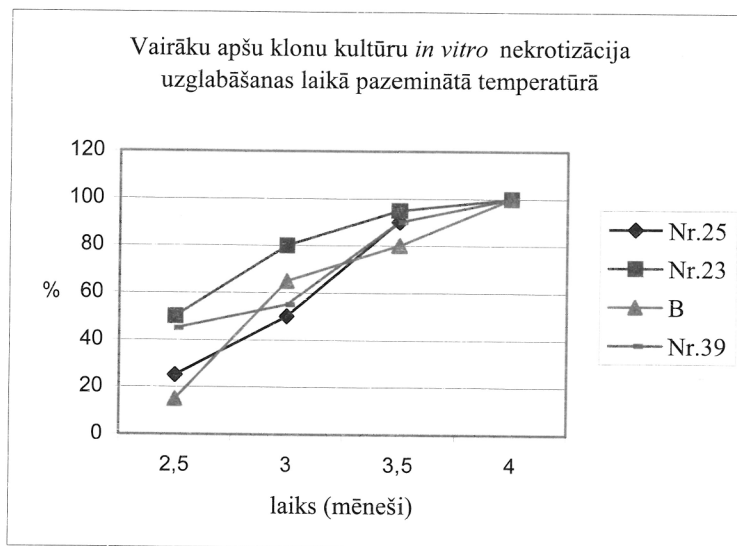
gaisu necaur laidīgu plēvi. Pēc 1-4 mēnešu ekspozīcijas pazeminātā temperatūrā trauki ar augiem pārvietoti uz audzēšanas telpu, pēc 2-3 dienām no kultūras *in vitro* atdalītie dzinumi pārstādīti svaigā multiplikācijas barotnē (1/2MS ar 0,2mg/l BAP) un paralēli - apsākšanas barotnē. Izmantota barotne 1/2MS ar 0,05 mg/l NAA, 0,1 mg/l IBA. Apsākšanās novērtēta procentuāli pēc 10, 15 un 20 dienām. Pēc 4 nedēļu multiplikācijas perioda parastos apstākļos audzēšanas telpā izvērtēta pirmās subkultūras dzinumu augšana - dzinumu skaits, garums, eksplanta svars, spontānās apsākšanās procents, sakņu skaits un garums saistībā ar ekspozīcijas laiku pazeminātā temperatūrā - un veikta rezultātu statistiskā apstrāde.

Pēc vairāku audzēšanas trauku ar augiem uzglabāšanas 1 gadu saldētavā tika novērtēta kultūru izdzīvošana.

Rezultāti

Hibrīdapšu stādu audzēšanai sekmīgi izmantojama pavairošana *in vitro*, bet grūtības rada iegūtā augu materiāla izstādīšana *ex vitro* un aklimatizēšana īsā laika sprīdī pavasarī, it īpaši, ja stādi audzējami neapkurināmās siltumnīcās. Uzglabāšana pazeminātā temperatūrā kavē *in vitro* kultūru augšanu, tādēļ to var izmantot kultūru uzkrāšanai pirms izstādīšanas pavasarī. Klonu arhīvu speciālās barotnēs pazeminātā temperatūrā (4-5°C) iespējams saglabāt pat vairākus gadus, bet ilgstoša proliferējošu kultūru uzglabāšana aukstumā izraisa dažādas negatīvas parādības: lapas nodzeltē un vēlāk nekrotizējas (1.att.), taču dzinumi labi saglabājas un pirmās atmiršanas pazīmes parādās tikai pēc 4-5 mēnešiem. Novērotas būtiskas atšķirības starp dažādas izcelsmes kloniem - lapu atmiršanas pazīmes ātrāk konstatētas kloniem 23, 36, 9, D'95; ilgāk zaļas lapas saglabājuši hibrīdapšu kloni 25, 4, 3'95 un triploīdo apšu klons R1. Visos gadījumos veselīgu izskatu ilgāk saglabājušas kultūras, kas pirms novietošanas saldētavā optimālo laiku – 4 nedēļas - augušas multiplikācijas barotnē. Pēc 3,5 mēnešu ekspozīcijas visiem kloniem lapas pilnībā nekrotizējas, bet dzinumi ar sānu pumpuriem saglabājas dzīvi ilgāk un pirmās galotņu nomelnēšanas pazīmes novērotas tikai pēc 6 mēnešiem. Nenobrieduši, sabiezināti stādīti dzinumi atmiruši ātrāk, savukārt labi nobriedušie dzinumi ātrāk zaudējuši lapas, bet *in vitro* kultūras dzīvotspēju saglabājušas vairāk nekā gadu – visa novērojumu perioda laikā.

Pēc ilgstošas uzglabāšanas 4-5°C temperatūrā dzinumu apsākšanās potenciāls samazinās. Ja apšu dzinumi no aktīvi augošas kultūras 95-100% gadījumu apsākjas 10-12 dienās, tad pēc 3 mēnešu uzglabāšanas – tikai 15-20 dienu laikā. Pēc 3,5-4 mēnešiem 10 dienās apsākjas tikai 25-35% (kloni Nr.23 un Nr.29); 50-80% dzinumu apsākjas 20 dienu laikā (1.tab). Novērotas atšķirības starp dažādas izcelsmes kloniem: labāk apsākjas klona Nr.23 dzinumi (90% - 20 dienās pēc 6 mēnešu uzglabāšanas aukstumā). Eksperimentu laikā adekvātai iegūto rezultātu salīdzināšanai dzinumi apsākoti sterilā barotnē, bet reālos stādaudzēšanas apstākļos apsākšana notiek reizē ar aklimatizāciju miglas siltumnīcā *ex vitro*, kas var ietekmēt stādu izdzīvošanu. No aktīvi augošas *in vitro* kultūras atdalīti dzinumi siltumnīcas apstākļos parasti apsākjas 85-90% gadījumu, bet barotnē - 99-100%.



1.attēls. Dažādas izcelsmes apšu klonu kultūru *in vitro* lapu pakāpeniska atmiršana ekspozīcijas laikā pazeminātā temperatūrā: kloni Nr.23, Nr.25, B hibrīdpase, Nr.39 – parastās apses triploīdais klons.

Fig.1. Survival of aspen leaves *in vitro* during cold storage. Nr.23, 25, B - hybrid aspen clones. Nr.39 - triploid aspen clone.

Pēc pārstādīšanas svaigā pavairošanas barotnē (1/2MS ar 0,2mg/l BAP) jaunās *in vitro* kultūras attīstību nosaka uzglabāšanas laiks

pazeminātā temperatūrā. Ilgstoša uzglabāšana 4-5°C temperatūrā pirms pārstādīšanas izraisa dzinumu skaita, garuma, kā arī eksplanta svara samazināšanos (2.tab.). Multiplikācijas koeficients pirmajā subkulturā strauji samazinās jau pēc 2 mēnešu ekspozīcijas, turpmāk tas mainās nedaudz – kultūras *in vitro* attīstība tiek kavēta, tomēr optimālos gaismas un temperatūras apstākļos augšana atjaunojas (2.att). Paredzams, ka turpmākajās 2-3 subkulturās apšu klonu dzinumu kultūru *in vitro* sākotnējais augšanas temps pilnībā atjaunosies. Jāatzīmē, ka dažādas izcelsmes klonu reakcija ir atšķirīga: starp dažādas izcelsmes hibrīdapses kloniem novērotas lielākas atšķirības nekā starp parastās apses triploīdajiem kloniem.

1.tabula Table 1.

Dažādas izcelsmes apšu klonu dzinumu apsākpošanās (%)
uzglabāšanas laikā pazeminātā temperatūrā

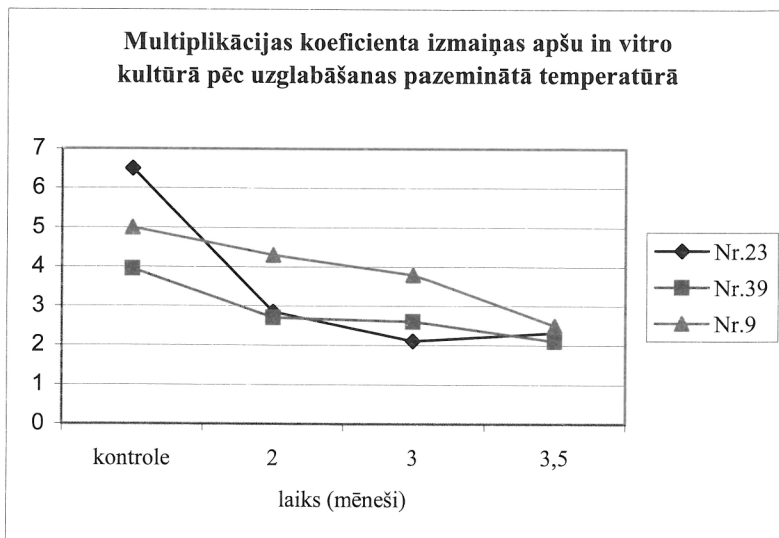
The rooting of microshoots (%) after cold storage

klons/ sakņ.laiks (dienas) clone/ rooting time (days)	saknes% (1,5mēn. uzgl.) rooting % (1,5 months stor.)	saknes% (2mēn. uzgl.) rooting % (2 months stor.)	saknes% (2,5mēn. uzgl.) rooting % (2,5 months stor.)	saknes% (3mēn. uzgl.) rooting % (3 months stor.)	saknes% (3,5mēn. uzgl.) rooting % (3,5 months stor.)	saknes% (4mēn. uzgl.) rooting % (4 months stor.)	saknes% (4,5mēn. uzgl.) rooting % (4,5 months stor.)	saknes% (6mēn. uzgl.) rooting % (6 months stor.)
Nr.23								
10	100	100	75	65	60	25	0	0
15						85	45	20
20							75	90
Nr.39								
10	70	85	45	50	35	0	0	0
15			80	70	60	20		12
20								50
Nr.44								
10	65	20	5	0	0	0	0	
15	85	74	70	40	25	0	10	
20						40	60	
R1								
10	50			30				
15	85			65				

2.tabula Table 2.

Dažādas izcelsmes apšu klonu augšanas raksturojums pēc uzglabāšanas 4-5°C temperatūrā atkarībā no ekspozīcijas laika saldētavā
The growth of aspen clones in vitro after cold storage

klons/ uzgl.laiks clone/ time of storage	dzin. gar. (cm) lengt of shoots (cm)	st. nov. stn. dev.	dzin. sk. Numb.of shoots	st. nov. stn. dev.	ekspl. svars (gr) weight (gr)	st. nov. stn. dev.	saknes (%) rooting (%)	sakņu skaits numb. of roots	st. nov. stn. dev.	sakņu gar. (cm) lengt of roots	st. nov. stn. dev.
Nr.23											
Kontr.	1,98	1,25	6,5	1,99	0,249	0,137	85	2	0,79	5,16	3,16
2mēn.	1,38	0,98	2,85	1,04	0,134	0,076	86	1	0	3,55	2,04
3mēn.	1,49	0,75	2,11	1,14	0,154	0,071	80	1,33	0,52	4,17	2,31
3,5mēn	1,43	0,72	2,32	1,64	0,186	0,08	35	1	0	3,75	2,46
Nr.39											
Kontr.	1,89	1,15	3,95	1,25	0,189	0,106	72,7	1	0	2,28	2,18
2mēn.	1,15	0,48	2,71	0,95	0,116	0,067	50	1	0	3,28	2,73
2,5mēn	1,12	0,51	3	1,11	0,122	0,055	0	0	0	0	0
3mēn.	1,03	0,6	2,6	1,1	0,085	0,042	30	1	0	1,44	0,73
3,5mēn	0,63	0,32	2,1	0,89	0,073	0,029	0	0	0	0	0
Nr.44											
2mēn.	1,18	0,49	2,5	1,24	0,081	0,044	10	1	0	0,5	0
Nr.28											
2,5mēn	1,29	0,63	3,7	2,05	0,242	0,142	60	2	1	2,34	1,16
Nr.9											
Kontr.	1,3	0,6	5	1,13	0,188	0,097	35	1	0	3,51	0,44
2mēn	1,28	0,63	4,3	2,36	0,147	0,079	20	1	0	2	0
3mēn.	0,94	0,49	3,8	1,23	0,097	0,034	40	1	0	0,8	0,38
3,5mēn.	0,85	0,54	2,5	1,08	0,106	0,055	0	0	0	0	0
30'95											
3mēn.	1,31	0,51	2,33	1,41	0,085	0,047	80	1,29	0,54	1,62	0,74
Nr.47											
3mēn.	1,46	0,68	2,71	0,49	0,098	0,053	57	2	0	4,57	1,72
B											
3,5mēn	1,45	0,49	2,29	1,07	0,117	0,067	72	1	0	3	0,71



2.attēls. Multiplikācijas koeficienta izmaiņas (jaunveidoto dzinumu skaits *in vitro*) pirmajā subkulturā atkarībā no uzglabāšanas laika pazeminātā temperatūrā.

Fig.2. Multiplication rates of aspen shoots in vitro during first subculture after cold storage.

Secinājumi

1. Hibrīdapšu *in vitro* kultūras iespējams ilgstoši sekmīgi uzglabāt pazeminātā temperatūrā (4-5°C).
2. Pēc 2-2,5 mēnešu ekspozīcijas pazeminātā temperatūrā hibrīdapšu kultūrām *in vitro* sākas lapu nomelnēšana un atmiršana; pēc 4 mēnešiem dzinumu lapas pilnībā atmirst. Apšu dzinumi *in vitro* saglabā dzīvotspēju 4-5°C temperatūrā vairāk nekā gadu.
3. Dzinumu apsākšanās laiks pēc 3 mēnešu uzglabāšanas pazeminātā temperatūrā pagarinās no 10 līdz 20 dienām; apsākšanās samazinās līdz 40-50%. Starp dažādas izcelsmes kloniem novērojamas būtiskas atšķirības.
4. Pazeminātā temperatūrā ilgstoši uzglabātu dažādas izcelsmes apšu *in vitro* kultūru augšana pēc pārstādīšanas pavairošanas barotnē sekmīgi atjaunojas.

Pētījums veikts, pateicoties Meža attīstības fonda (MAF) 2005.gadā piešķirtajam finansējumam.

Literatūra

- Ahuja M.R. 1984. A commercially feasible micropropagation method for aspen. *Silvae Genetica*. 33: 174-176.
- Chalupa V.1987. European hardwoods. *Cell and Tissue Culture in Forestry*.3: 224-246.
- Douglas G.C. *Poplar (Populus spp.)*. 1989. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees II.* (ed. by Y.P.S. Bajah), pp.301-323.
- Hausman J.-F., Neys O., Kevers C., Gaspar T. 1994. Effect of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of poplar shoots. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 38: 65-67.
- C.Kevers, T.Franck, R.J.Strasser, J.Dommes, T.Gaspar. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 77: 181-191.
- Klavina D., Ievinsh G., Megre D., Jakobsone G. 2001. Changes of physiological status during cold storage of *in vitro* cultivated plants. Abstracts of 1st International Symposium on "Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants" , September 19-22, 2001. Greece.
- K.Pruski, T.Kozai, T.Levis, T.Astatkie, J.Nowak . 2000. Sucrose and light effects on *in vitro* cultures of potato, chokecherry and saskaton berry during low temperature storage. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 63: 215-221.
- J.Renaut, J.F.Hausman, S.Lutts. 2001.Chill-induced reactions in Poplar. *Proc.IV IS on InVitro Cult.&Hort.Breeding*. Eds.S.Sorvari *et al.* Acta Hort.560, ISHS 2001, pp. 307-309.
- Romano A., Martins-Loução M.A. 1999. *In vitro* cold storage of cork oak shoot cultures. *Plant Cell Tiss. Org.Cult.* 59: 155-157.