

Triploīdās apses (*P.tremula*) un hibrīdapses (*P.tremuloides* × *P.tremula*) klonu pavairošana audu kultūrā *in vitro*

I.Dubova, Nacionālais Botāniskais dārzs

Kopsavilkums. Rakstā analizēta dažādas izcelsmes apšu klonu augšana un attīstība atšķirīga sastāva barotnēs audu kultūrā *in vitro*. Salīdzināta piecu kokaugu pavairošanā izmantoto barotņu (MS, WPM, BTM, GD, AC), ar atšķirīgu minerālāļu sastāvu, ietekme uz apšu klonu augšanu. Barotnēm pievienoti fitohormoni – BAP (0-2mg/l), ISS (0- 0,01 mg/l), kinetīns (0,005mg/l). Pēc 4 nedēļu kultivēšanas perioda uzskaitīts jaunveidoto dzinumu skaits, garums, eksplanta svars, apsākpošanās procents, sakņu skaits, garums. Triploīdo apšu un hibrīdapšu kloni *in vitro* pielāgojas plašam barotņu sastāva diapazonam, to reakciju nosaka klona īpatnības. Optimālā minerālā pamatbarotne ir WPM, piemērotas arī BTM un ½ MS; vislielākais multiplikācijas koeficients konstatēts barotnēs ar BAP 0,5-0,6mg/l, ilgstošai kultivēšanai piemērotas barotnes ar BAP 0,1-0,2 mg/l. Grūti pavairojamu apšu klonu sekmīgai kultivēšanai ieteikts izmantot barotnes WPM vai AC ar zemu BAP koncentrāciju (0,1-0,2mg/l), periodiski tās nomainot ar lielākām (0,5mg/l).

Nozīmīgākie vārdi: apšu kloni, *in vitro*, barotņu sastāvs.

...

I.Dubova, National Botanic Garden. **Micropropagation of triploid aspen (*P.tremula*) and aspen hybrids (*P.tremuloides* × *P.tremula*) *in vitro***

Abstract. Triploid aspen and hybrid aspen clones were *in vitro* propagated using different basal media (MS, WPM, BTM, GD, AC) supplemented with fitohormones – BAP (0-2,0 mg/l), ISS (0-0,01mg/l), kinetin (0,005 mg/l). The shoot growth, multiplication rate, weight of explants and rooting of shoots were measured after 4 weeks period of cultivation. The optimum nutrient media for increase multiplication rate were WPM, as well as BTM and ½ MS supplemented with BAP 0,5-0,6 mg/l. The best medium for long-term cultivation were ½ MS with BAP 0,1-0,2mg/l. For successful culturing difficult propagated clones recommended WPM and AC media supplemented with low BAP concentrations (0,1-0,2mg/l) exchanging it with BAP 0,5mg/l.

Key words: aspen clones, *in vitro*, media

...

Дубова И., Национальный Ботанический сад. **Микроклональное размножение *in vitro* клонов триплоидной (*P.tremula*) и гибридной (*P.tremuloides* × *P.tremula*) осин**

Резюме. В культуре ткани *in vitro* успешно размножены клоны триплоидной и гибридной осин, используя разные основные минеральные среды питания, с добавлением

регуляторов роста – БАП (0-2,0 мг/л) ИМК (0-0,01 мг/л) и кинетина (0,005 мг/л). При оценке роста клонов учитывались: число и длина побега, вес экспланта, процент укоренения, число и длина корней. Проведенные опыты показали, что максимальный коэффициент мультипликации достигается в питательной среде WPM, а также ВТМ и 1/2 MS с добавлением БАП 0,5-0,6 мг/л. Для культивирования клонов с низким коэффициентом размножения рекомендуется чередование среды с БАП 0,01-0,02 мг/л и 0,5 мг/л.

Ключевые слова: клоны осины, *in vitro*, питательные среды.

Ievads

Mikropavairošanas metodes pamatā ir somatiskās organoģenēzes procesa inducēšana no nediferencētiem audiem – kallusa vai meristēmas - un auga orgāniem – sēklu digļiem, pumpuriem, lapām, ziedu daļām u.c., kas tiek kultivēti aseptiskos apstākļos *in vitro*. Sekmīgi ir apgūta daudzu kokaugu sugu, t.sk. visu saimnieciski nozīmīgāko *Populus* ģints sugu un hibrīdu, pavairošana *in vitro* (Ahuja, 1986; Rutledge, 1988; Douglas, 1989; Welander, 1989). Sākotnēji tika izolētas *P. tremula*, *P. deltoides* u.c. nediferencēta kallusa audu kultūras un no tām reģenerēti jaunie augi (Winston, 1968, Saito 1980). No *P. maximowiczii* putekšņiem iegūts haploīds embriogēns kalluss un reģenerēti haploīdi augi (Stoehr, 1990). Kallusa audus var iegūt no izolētas pumpura meristēmas un izaudzēt no vīrusiem brīvus augus (Rutledge, 1988). Konstatēts, ka apses kallusa veidošanās intensitāti nosaka gēnu komplekss (nepilnīgās dominēšanas princips - dominējošā pazīme ir intensīva kallusa veidošanās) (Машкина 2001). Daudzām kokaugu (*Fagus*, *Fraxinus*, *Acer*, *Tilia* sp.) kallusa kultūrām raksturīga zema organoģenēzes spēja, citām (*Betula*, *Sorbus*, *Alnus*, *Ulmus* sp.) - labāka (Chalupa, 1987).

Dažādu augu kultivēšanai praksē ir izstrādātas vairākas barotnes. Parasti kokaugu

pavairošanai izmanto MS (Murashige and Skoog) barotni, kas sākotnēji tika izveidota tabakas kallusa kultivēšanai un uzskatāma par universālu. Atšķirības starp barotnēm nosaka dažāds makroelementu daudzums: MS barotnē attiecība N:P:K = 10,2 : 1 : 9,5 ; savukārt WPM (Woody Plant Medium) barotnē tā ir 5,1:1:6,4. Svarīga ir amonija un nitrātu jonu attiecība un hlora saturs. Oglekļa avots barotnē ir saharoze, kas nosaka arī osmotisko koncentrāciju. Barotnēm vienmēr pievieno B, C un PP grupas vitamīnus, mezo-inozītu, citas aminoskābes. Vissvarīgākie organiskie komponenti ir augšanas regulatori – fitohormoni – auksīni, citokinīni, giberelīni u.c., kas nosaka *in vitro* kultūras attīstību. Liela nozīme ir auga endogēno augšanas regulatoru un barotnes fitohormonu savstarpējai mijiedarbībai.

Izolēti adventīvie pumpuri *in vitro* plaukst un veido dzinumus, ko iespējams izmantot turpmākā mikropavairošanā, t.s. dzinumus kultūrā. Apšu dzinumus kultūras iniciācijai eksplantus (dzinuma posms ar pumpuru) novieto uz barotnes, kas satur BAP (benziladenīns) 0,25-0,75 mg/l. Veidojas jauns dzinums, ko izmanto tālākai pārstādīšanai svaigā barotnē ar samazinātu BAP koncentrāciju – 0,1 mg/l, kur dzinumi sasniedz 6-8 cm garumu: tos var sadalīt atsevišķos posmos ar 1-2 pumpuriem un izmantot turpmākai pavairošanai. Ja BAP

koncentrācijā 0-0,05 mg/l, dzinumazarošanās nenotiek, bet pavairošanai (multiplikācijai) par optimālo koncentrāciju uzskatāma 0,1-0,25 mg/l, savukārt 0,3-0,5 mg/l izraisa dzinumu veidošanos pat no izolētiem stumbra segmentiem (Ahuja, 1983; Naujoks, 1987). Apsakņošanu veic barotnē ar samazinātu minerāl sāļu koncentrāciju un NAA (naftalēn-etikskābe) 0,05 mg/l (Ahuja, 1983) vai kombinējot NAA un IBA (indolilsviestskābe), kas sekmē optimālu attiecību veidošanos starp galveno un sānsaknēm (Naujoks, 1987). Sekmīgi augošanas apšu vai papēļu *in vitro* kultūras pavairošanas koeficients parasti ir 2-3, bet maksimāli var sasniegt 10-15; tomēr atsevišķi kloni vairojas slikti, kas skaidrojams ar ģenētiski noteiktu endogēno fitohormonu sastāvu (Ahuja, 1983; Kusiene 2004). Kokaugu audu kultūrās problēmas sagādā endogēnās infekcijas - parasti tās ir grampozitīvas, relatīvi karstumizturīgas baktērijas (Naujoks, 1987; Ahuja, 1983).

Analizējot 25 apšu klonus, kas pārstāv 5 ģimenes, konstatēta būtiska saikne starp BAP koncentrāciju barotnē, jauno dzinumu skaitu un klonu izcelsmi. Kloni, kuru optimālai attīstībai piemērota zema BAP koncentrācija, *in vitro* aug un nobriest lēnāk. Apsakņošanās procesā klonu atšķirības nav būtiskas; nav konstatēta arī korelācija starp klonu attīstību *in vitro* un augšanas gaitas parametriem lauka apstākļos (Ahuja 1988).

In vitro kultūras viegli veido juvenili augi – sējeņi, jauni un intensīvi augoši īpatņi, sakņu atvases u.c. (Ahuja, 1983; Chalupa, 1987; Douglas, 1989). Izstrādātas metodes arī pieaugušu *P.tremula* un *P.tremuloides* koku pavairošanai *in vitro*, par izejmateriālu izmantojot koka vainaga dažādu daļu pumpurus. No 17-40 gadus veciem kokiem sekmīgi iegūta kultūra 26 (no 48) kloniem; dzinumu diferencēšanos *in vitro* nenosaka koka

vecums un dzimums, bet gan klonu genotips (Ahuja, 1983). Kultūra *in vitro* sekmīgi iniciēta arī no 100-gadīga koka. (Ahuja, 1983; 1984). Masveida *P.tremula* klonu pavairošanai tiek rekomendētas 3-4 posmu, kā arī vienkāršākas – 2 posmu komerciāli izmantojamas metodikas, kas paredz apsakņošanu veikt *ex vitro* (Ahuja, 1983).

Hibridapses *in vitro* kultūru var ilgstoši uzglabāt 4°C temperatūrā - novērota lapu dzeltēšana un atmiršana, bet dzinumi izdzīvo un turpmāk attīstās normāli. Augšanas perioda garums pirms novietošanas aukstumā rezultātus neietekmē, bet uzglabāšana tumsā samazina lapu nekrozi un palielina multiplikācijas koeficientu nākamajā pavairošanas ciklā (Hausman, 1994).

Amerikas apsēs (*P.tremuloides*) un parastās apsēs (*P.tremula*) un abu sugu hibrīdu ievadīšana un kultivēšana *in vitro* ir līdzīga – pieaugušu 80-100 gadus vecu koku ziemas pumpuriem konstatēta ļoti zema organoģenēzes spēja: eksplanta lapas plaukst, bet dzinums praktiski neveidojas; savukārt sakņu atvasēm raksturīga juvenila augšana un tās viegli veido kultūru *in vitro*. Turpmākai dzinumu multiplikācijai un elongācijai piemērotākās ir barotnes ACM un WPM ar zemu fitohormonu koncentrāciju – BAP 0,2-0,9 mg/l un NAA 0,01-0,1 mg/l. Multiplikācijas koeficients, atkarībā no klonu, ir 2-4,5. (Tpona, 1990; Dubova, 1995).

Pieaugušu, ražojošu koku veģetatīvo pavairošanu kavē mātesaugu novecošanās process. Novecošanās un juvenilizācija precīzi ir grūti definējamas, tās izpaužas kā virkne morfoloģisku un anatomisku atšķirību. Galvenā ir reproduktīvā spēja – ziedēšana un sēklu ražošana, kas raksturo pieaugušu īpatni. Koka novecošanās gaitā meristematiskajos augšanas centros notiek izmaiņas, kuru rezultātā ir apgrūtināta spraudņu apsakņošanās, rakstu-

rīga plaģiotropiska spraudenstādu augšana, kā arī reģenerācijas spēju samazināšanās *in vitro*. Tajā pašā laikā daudzas kokaugu sugas (arī papeles) dabā vairojas galvenokārt veģetatīvi, vienlaikus saglabājot ģenētisko stabilitāti. Dažas koka zonas saglabā juvenilās īpašības ilgāk nekā citas, piemēram, saknes ilgstoši spēj veidot veģetatīvas atvases ar juvenilu augšanas raksturu. Koka virszemes daļai raksturīgi, ka tuvāk saknēm dzinumus meristēma ir juvenilāka – tā ir sakņu, celma un stumbra atvases vainaga apakšējā daļa. Praksē, lai panāktu jaunu dzinumus veidošanos no snaudošajiem celma pumpuriem, izmanto apgriešanu („atsēdināšanu uz celma”). Teorētiski šūnas vai meristēmas vecums ir proporcionāls šūnu dalīšanās ciklu skaitam, kas to šķir no zigotas. Uzskata, ka šūnu grupas ar zemu aktivitāti var ilgstoši saglabāties latentā stāvoklī un nodrošināt veģetatīvās atjaunošanās potenciālu tādu sugu kokiem, kas vairojas ar atvasēm (Bonga, 1982).

Apse dabiskos apstākļos vairojas veģetatīvi, un dabiskās apšu audzes veido mozaikveidā augoši kloni. Unikāla ir Amerikas apses *P. tremuloides* audze ASV Jūtas štatā (Wasatch Mountains), kas sastāv no 47 000 ģenētiski identisku viena vīrišķā klona kokiem ar vienotu sakņu sistēmu, kuri tiek uzskatīti par vienu no lielākajiem dzīvajiem organismiem (Mitton, 1993).

Juvenili eksplanti no sējeņiem vai pieaugušu koku sakņu atvasēm un stumbra apakšējās daļas daudz vieglāk un ātrāk veido *in vitro* kultūru. Sakņu atvases no konkrētā koka saknēm audzē siltumnīcā, bet atvašu segmentus ar pumpuriem izmanto *in vitro* kultūras iniciācijai (*Ulmus*, *Sorbus*, *Prunus*, *Populus* sp.). Stumbra un celmu atvases izmanto *Quercus*, *Tilia*, *Castanea*, *Acer* sugu pavairošanai. Atsevišķu sugu kokus ir iespējams pavairot no vainaga zemākajiem zariem (*Betula*, *Populus*). Pieaugušu koku sekmīgai pavairošanai

nepieciešama to rejuvenilizācija, kas panākama ar māteskoku atkārtotu apgriešanu, potēšanu un atjaunošanu ar spraudeniem vai apsmidzināšanu ar BAP šķīdumu. *In vitro* kultūra ir ļoti efektīva rejuvenilizācijas metode (Chalupa, 1987).

Dzinumu reģenerācija citokinīnu ietekmē (BAP, kinetīns, 2iP, zeatīns) iespējama arī no saknēm, kas augušas *in vitro*. Vislabākie rezultāti iegūti, izmantojot 8-10 cm garus un 60 dienas vecus *Populus hybr.* sakņu posmus (Sung, 1990).

Primārā dzinuma augšana *in vitro* ir atkarīga no eksplanta (pumpura) lokalizācijas vietas. Kultūras iniciācijai izmantojot 17 gadus vecu hibrīdapses klonu pumpurus no koka vainaga zariem un sakņu atvašu galotnēm, kas ievāktas maija sākumā, konstatēts (Staniene, 2001), ka vislabāk aug eksplanti no sakņu atvašu galotnēm – 55%, bet no koka vainaga apakšējās vai centrālās daļas – tikai 5-10%. Iniciācijas barotne ir MS ar paaugstinātu BAP koncentrāciju (0,75 mg/l); novērots daudz infekciju (līdz 70%). Starp kloniem nav konstatētas atšķirības, un pēc zināma stabilizācijas laika visas kultūras attīstās līdzīgi, kas skaidrojams ar juvenilizācijas procesiem *in vitro* kultūrā. Pavairošanas koeficients ir 1,4-3,3 (Staniene, 2001; Kusiene, 2004). Uzskata, ka *in vitro* kultūru iniciācijas sekmes nosaka koka ontoģenētiskais vecums un eksplanta fizioloģiskā rejuvenilizācija (Staniene, 2001). Optimālais dzinumu garums sekmīgai (88-94%) apsākpošanai un aklimatizācijai ir 2,8-4,5 cm. Stādi siltumnīcā tiek izstādīti līdz jūnija beigām un rudenī sasniedz 1-1,5 m (Kusiene, 2004).

Audu kultūrā *in vitro* pavairotus un apsāknotus kokaugu stādus īsāku vai ilgāku laiku (1-3 nedēļas) aklimatizē, lai tie adaptētos zemākam gaisa mitrumam, augstai temperatūrai un gaismas intensitātei *ex vitro*.

Augi no barotnes *in vitro* uzņem cukuru, tādēļ fotosintēzes aktivitāte ir samazināta; pēc izstādīšanas augsnē nepieciešamas vismaz divas nedēļas, lai normalizētos ogļhidrātu vielmaiņa (Chalupa, 1987). Laboratorijā apsakņotiem sīkstādiem aklimatizāciju veic audzēšanas kamerā ar kontrolējamiem vides parametriem - paaugstinātu gaisa mitrumu (ko pakāpeniski samazina), noteiktu augšnes un gaisa temperatūru, apgaismojumu -, līdz izveidojas vairāki jauno lapu pāri, kas anatomiski ir pielāgoti zemam gaisa mitrumam, un teorētiski to iespējams veikt visu gadu. Labvēlīgos apstākļos ieaugšanās ir 90-100%. Stādus audzē siltumnīcā arī turpmāk vai izstāda laukā. Stādi ir izturīgi pret izsalšanu pirmajā ziemā, kad bieži cieš spraudņstādi (Chalupa, 1987, McCown, 1989). Ģenētiskā stabilitāte audu kultūrās atkarīga no kultūras veida - par stabilām tiek uzskatītas t.s. orgānu kultūras (Chalupa, 1987). Fenotipiskas izmaiņas no kallusa kultūras iegūtiem bērzu stādiem nav novērotas (Simola, 1985).

Vācijā *in vitro* pavairojot hibrīdapšu klonu, kā arī triploidās apses šķirnes *Astria* stādus, iegūti dzinumi apsakņojās 8-10 dienās; apsakņošana izdarāma tieši kūdras un smilts maisījumā, ja iespējams nodrošināt paaugstinātu gaisa mitrumu - 80%. Pārskološanai atklātā laukā vai plēves seguma siltumnīcā piemēroti pilnīgi norūdīti un vismaz 10 cm gari stādi, tā veicama no maija vidus līdz, vēlākais, 10. jūlijam. Veģetācijas perioda beigās stādi laukā sasniedz 60 cm garumu vai 150 cm garumu siltumnīcā. Kopumā izaudzēti apmēram 100 000 stādi (Naujoks, 1987). Citi autori, pavairojot triploīdo apses šķirni *Astria*, apsakņošanai izmantojuši 3-5 cm garus dzinumus, pēc 15 cm garuma sasniegšanas tie pārskoloti un 7 mēnešu ilga veģetācijas perioda beigās augu garums bijis jau 1,0-2,5 m. Šādi izaudzēti 300 000 stādi (Barocka, 1985).

Audu kultūras *in vitro* ir īpaši piemērotas teorētisku pētījumu veikšanai ar mērķi risināt fizioloģiskus, bioķīmiskus un ģenētiskus jautājumus, jo augi tiek kultivēti pilnīgi kontrolējamos vides apstākļos - sterilā barotnē.

Organoģenēzes morfoloģisko procesu izpēte *Populus hybr.* lapu griezumā audos *in vitro* ļauj secināt, ka dzinuma reģenerācijai nepieciešama vismaz 40-50 šūnu liela grupa: minimālais eksplanta lielums - 200 μm biezs lapas centrālās dzīslas griezumā ar 4-5 šūnu kārtām. Morfoģenēzes centri ir hlorofilu saturošas parenhīmas šūnas, kas veido zaļu kallusu, no kura 2-3 nedēļās barotnē ar 0,02 mg/l NAA un 0,2 mg/l BAP izaug jauni dzinumi (Lee-Stadelmann, 1989).

Arī dzinuma stumbra starpposmi spēj veidot jaunus dzinumus - morfoģenētisko kapacitāti nosaka ģenotips, endoģenie hormoni, polaritāte (Douglas, 1984). Minimālais stumbra eksplanta garums ir 4 mm. Donorauga aksilārais pumpurs nomāc reģenerāciju - tas saistīts ar endoģēno auksīnu un abscisskābes gradientu, kā arī citokinīnu saturu stumbra audos. Adventīvie pumpuri veidojas no kambija un floēmas šūnām (10 dienās) starp ksilēmas audiem un floēmas šķiedrām. Jauni dzinumi veidojas 4-5 nedēļu laikā stumbra posma apikālajā daļā (80 %), bet bazālajā daļā aug kalluss (Douglas, 1984).

Daudzas papeļu sugas izmanto sausumizturības fizioloģijas pētījumos. *P.tremula* kultūrā *in vitro* ir identificēti vairāki specifiski proteīni un šķīstošo cukuru sintēzes īpatnības, ko izraisījusi auga reakcija uz ūdens trūkuma stresu (Altman, 1996). *Peuphratica* - suga no sausajiem Ķīnas reģioniem - ir izcili izturīga pret karstumu, sāļām un sausām augsnēm, bet grūti pavairojama (Kang, 1996). *In vitro* protoplastu kultūra, kas iegūta no lapu audiem, ļauj izmantot to somatiskās hibridizācijas un ģenētiskās transformācijas

eksperimentos. Lapu audi tiek apstrādāti ar fermentiem, protoplasti kultivēti šķidrā barotnē ar 2,4D un BAP, kur tie veido šūnu kolonijas. Pēc 150-200 dienām veidojas kallusa audi, kuru attīstībai nepieciešama gaismā un NAA. No kallusa, barotnē ar BAP 0,8 mg/l, reģenerēti dzinumi, kas sekmīgi apsakņoti. (Kang, 1996).

Apšu *in vitro* kultūrām raksturīga augsta reģenerācijas spēja, kas ļauj tās izmantot gēnu transformācijas eksperimentos, sekmīgi inducējot transformētajos augos rezistenci pret kanamicīnu. Transformācijai izmantoti hibrīdapses lapu diski, kas kultivēti kopā ar *Agrobact.t.LBA 4404* ar bināru vektoru, kas satur GUS marķiergēnu. Eksperimenta modelis tiek ieteikts izmantošanai turpmākajiem pētījumiem (Mala, 1993).

Metodika

Pētījumā izmantoti hibrīdapses un parastās apses triploīdu kloni no laboratorijā *in vitro* izveidotās klonu kolekcijas. Izejmateriāls ievākts apšu izmēģinājuma kultūrās, kuras bijušajās lauksaimniecības zemēs MPS "Kalsnava" 286.kvartālā no 1966.gada līdz 1983. gadam ierīkojis mežzinātnieks Jānis Smilga. Šajā stādījumā (arhīvā), kā potējumi uz parastās apses, iestādīti arī Latvijā atrastie 4 triploīdās apses kloni, kas pēc fenoloģiskajām pazīmēm tika identificēti 1975.gadā Igaunijā, Tartu universitātē (Tamm, Jeverkilga), hromosomu skaits noteikts citoloģiski. Atkārtoti triploīdo klonu kariotipa citoloģiskā analīze izdarīta 2005. gadā Bioloģijas institūtā (D.Grauda).

Kolekcijas saglabāšanai *in vitro* izmantota pamatbarotne – MS (Murashige and Skoog) ½ koncentrācijā, ar zemu fitohormonu limeni (BAP 0,1 mg/l, ISS 0,01 mg/l, kinetīns 0,005 mg/l). Kolekcijas kloni pēc 2-3 mēnešu kultivācijas perioda pārstādīti svaigā barotnē. Pavairošanās koeficients 1-2; augi spontāni apsakņojas un aug garumā. Pārstādīšanai

parasti izmantota 1-2 cm gara dzinuma galotne; dzinumam iespējams sagriezt posmos ar vismaz vienu pumpuru, bet tas aizkavē kultūras attīstību. Audzēšanas telpā apgaismojumu nodrošina luminiscentās lampas: fotoperiods 16 stundas, temperatūra 22-25°C. Lai panāktu maksimālu pavairošanās intensitāti, nepieciešams palielināt fitohormonu koncentrāciju barotnē un saīsināt kultivēšanas periodu. Savukārt paaugstināta BAP koncentrācija augiem var būt toksiska, tādēļ iespējama vitrifikācija, pastiprināta kallusa veidošanās, augšanas depresija, kroplīgi dzinumi.

Darba gaitā tika pārbaudīti vairāki barotņu varianti, kombinējot dažādas minerāl sāļu pamatbarotnes – MS, WPM, AM, BTM, GD (1.tab.) - un fitohormonu koncentrācijas: BAP 0,1-2,0; ISS 0,01-0,1 mg/l. Kultūras pārstādītas ik pēc 4 nedēļu kultivēšanas, kad no dzinuma bazālās daļas izveidojušies vairāki jauni dzinumi un kalluss vai saknes. Stādīšanai svaigā barotnē izmantotas dzinumu galotnītes (ap 1 cm), bet kallusa audi atdalīti un turpmākā pavairošanā nav izmantoti. Katrā variantā ir mazāk nekā 25 dzinumi. Audzēšanai parasti lietotas mēģenes vai kolbas, bet barotņu variantu pārbaudei kultūras stādītas 300 ml tilpuma stikla traukos (burciņās), kur 25-30 ml aizņem barotne; trauki noslēgti ar folijas vāciņiem.

Pēc 4 nedēļu kultivēšanas audzēšanas telpā uzskaitīts dzinumu skaits, garums, eksplanta svars, apsākšanās procents, sakņu skaits, garums, iespējamā vitrifikācija. Iegūtie dzinumi apsākņoti barotnē 1/2MS ar 0,05 mg/l NAA, 0,1 mg/l IBA, uzskaitīts apsākšanās procents, laiks; stādi aklimatizēti un audzēti plēves seguma siltumnīcā (z/s Igaijas, īp. A.Kaškure). Veikta rezultātu statistiskā apstrāde.

Pētījumā izmantoti kloni R1, C1, nr.39, nr.23, nr.44. Triploīdajiem kloniem

no Reņģes (R1) un Cirkales (C1) raksturīgs zems multiplikācijas koeficients *in vitro* – uz izmantotās standartbarotnes ar zemu BAP koncentrāciju veidojās tikai 1-2 jauni dzinumi; fitohormonu koncentrācijas palielināšana stimulēja kallusa veidošanos. Triploidam nr.39 pavairošanās intensitāte bijusi vidēja. Hibrīdapses klons nr.23 ļoti intensīvi vairojies *in vitro*, bet lauka pārbaudēs konstatēti vidēji augšanas rādītāji; savukārt hibrīdapses klons

nr.44 vidēji labi audzis gan audu kultūrā, gan lauka apstākļos. Triploidiem raksturīga augsta rezistence pret serdes trupi: augšanas ātrums ir lielāks nekā parastajai apsei un tikai nedaudz atpaliek no hibrīdapses.

Nav novērota tieša saistība starp augšanu *in vitro* un *ex vitro*, tomēr galvenais izvēles kritērijs klonu pavairošanai un stādu audzēšanai, protams, ir koku augšanas gaita lauka izmēģinājumos – plantācijā.

1.tabula, Table1

Minerālsāļu sastāvs (mg/l) barotnēs MS (Murashige and Skoog), WPM (Woody Plant Medium), BTM (Broad-leaved Trees Medium), GD (Gresshoff and Doy), AC (Aspen Culture Medium)

Basal salt formulations (MS, WPM, BTM, GD, AC) mg/l

Minerālsāļi	MS	WPM	BTM	GD	AC
KNO ₃	1900	-	190	1000	-
NH ₄ NO ₃	1650	400	165	-	400
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	96	44	150	96
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	556	640	-	556
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	240	200	-
K ₂ SO ₄	-	990	860	-	990
KCl	-	-	-	300	-
MgSO ₄	370	370	370	250	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170	-	170
NaH ₂ PO ₄	-	-	-	90	-
Na ₂ HPO ₄ ·xH ₂ O	-	-	-	30	-
Fe (helāts)	65	65	65	65	65
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	3	6,2
MnSO ₄ ·xH ₂ O	22,3	22,3	22,3	10	22,3
ZnSO ₄ ·x7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	3	8,6
KJ	0,75	-	0,15	0,75	0,83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ ·x5H ₂ O	0,025	0,25	0,025	0,025	0,025

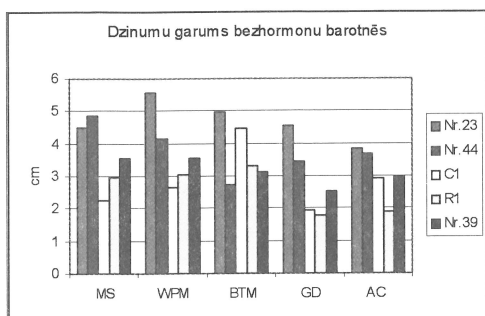
Minerālsāļi	MS	WPM	BTM	GD	AC
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,02	-	0,02	0,25	0,025
Organiskie savienojumi					
Myo-inositols	100	100	100	10	100
Glicīns	2	2	-	4	2
Glutamīns	2	2	-	-	2
Tiamīna hlorīds	0,1	1,0	0,5	0,5	0,1
Piridoksīna hlorīds	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Nikotīnskābe	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lizīns	-	-	-	-	100
Adenīna sulfāts	20	-	-	-	-
Saharoze	20 000	20 000	20 000	20 000	20 000

Rezultāti

Darba mērķis ir noskaidrot optimālos hibrīdapšu un triploīdo apšu klonu kultivēšanas *in vitro* nosacījumus un meklēt iespējas maksimālai multiplikācijas koeficienta paaugstināšanai saimnieciski nozīmīgiem, augstražīgiem kloniem. Literatūras dati, arī novērojumi Latvijā, liecina, ka pavairošanās intensitāte *in vitro* un augšanas gaita plantācijā nav saistītas. Līdz šim pārbaudītajiem hibrīdapšu kloniem *in vitro* pavairošanas koeficients bijis 3-7, ko nosaka izmantoto barotņu ķīmiskais sastāvs un klona īpatnības. 1.tabulā apkopots kokaugu mikropavairošanai parasti izmantojamo barotņu ķīmiskais sastāvs. MS (izmanto ½ konc.) un WPM tiek uzskatītas par pamatbarotnēm. AS ir kombinēta barotne, kas sastāv no WPM makrosāļu un MS mikrosāļu apvienojuma, kā organisko komponentu pievienojot aminoskābi lizīnu. Lai salīdzinātu dažādas izcelsmes klonu augšanu, tika izmantotas minerālās barotnes bez fitohormoniem (1., 2. att.). Šajos gadījumos visi kloni auga līdzīgi – barotnē iestādītais

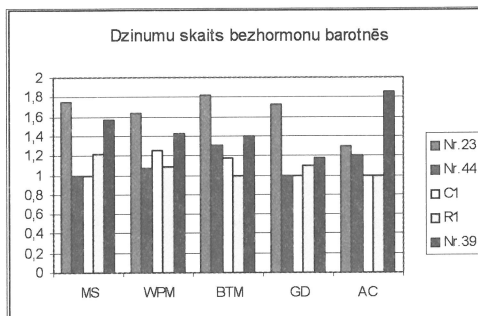
dzinums pēc aptuveni 10 dienām izveidoja saknes un auga garumā, neveidojot kallusu.

Hibrīdapses klonam nr.23 raksturīgas sīkas lapiņas; bezhormonu barotnēs tas veido 1,6-2 dzinumus, kas 4 nedēļu laikā sasniedz vislielāko garumu – līdz 5 cm. Triploīdie kloni C1 un R1 bezhormonu barotnē aug tikai ar vienu galotni, tiem ir lielākas lapas un drukni, īsi dzinumi (2-3 cm), kas maksimālo garumu sasniedz barotnē BTM. Triploīdais klons nr.39 aug līdzīgi hibrīdapsēm – dzinumi stiepjas garumā, to vidējais skaits 1,2-1,8. Hibrīdapses kloni vislabāk aug WPM un ½ MS barotnēs. Klons C1 un klons nr.39 ļoti labi aug barotnē AC, savukārt R1 šī barotne nav piemērota. Vismazāk piemērota bijusi barotne GD - tajā normāli attīstījies tikai klons nr.23; pārējās barotnes vērtējamās kā piemērotas dažādu apšu klonu kultivēšanai *in vitro*. Barotne AC (ar lizīna piedevu) ir izveidota speciāli apšu pavairošanai, taču klonu augšanā būtiskas atšķirības no citām barotnēm nav novērotas.



1. attēls. Dažādas izcelsmes apšu klonu dzinumu garums *in vitro* atšķirīga minerālā sastāva bezhormonu barotnēs.

Figure 1. The height of young shoots in different basal media.



2. attēls. Dažādas izcelsmes apšu klonu dzinumu skaits *in vitro* atšķirīga minerālā sastāva bezhormonu barotnēs.

Figure 2. The number of young shoots in different basal media.

Palielinot BAP koncentrāciju, visu klonu dzinumu garums samazinās no 2,5-5 cm bezhormonu barotnē, kur tas visiem kloniem ir vislielākais, līdz 0,5-1 cm barotnēs ar 1-2 mg/l BAP. Plašā koncentrāciju diapazonā (0,2-1mg/l) apšu klonu dzinumu garums izmainās maz.. 3.attēlā parādītas dzinumu garuma izmaiņas barotnē ½ MS, kas sekmīgi tiek izmantota kā standartbarotne dažādu apšu klonu pavairošanai. Līdzīga dinamika raksturīga visām pārbaudītajām barotnēm.

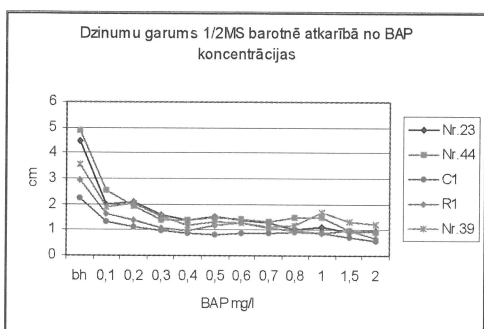
Visaugstākais multiplikācijas koeficients (jauno dzinumu skaits) visās barotnēs ir kloniem nr.23, nr.44 un nr.39. Kā optimālo barotni apšu kultivēšanai *in vitro* parasti iesaka ½ konc. MS (3.,4.,5.,6. att.) vai WPM ar 0,1-0,3 mg/l BAP un IBA 0,05mg/l. Šādas, visumā nelielas, fitohormonu koncentrācijas nodrošina kultūru izlīdzinātu, vienmērīgu augšanu, nelielu multiplikācijas koeficientu – triploīdajiem kloniem 2-4, hibrīdapsei nr.23 tas ir 5-7: tādējādi viskrasāk izpaužas klonu ģenētiskās atšķirības (4.att.).

Maksimālais jauno dzinumu skaits klonam nr.23 un R1 veidojas barotnēs ar

BAP koncentrāciju 0,2-0,4 mg/l. Hibrīdapses klonam nr.44 un triploīdam C1 vislielākais multiplikācijas koeficients konstatēts barotņu variantos ar BAP koncentrāciju 0,5-0,6 mg/l ½ MS barotnē (4.att.), kā arī WPM, GD un AC barotnēs. Triploīdais klons nr.39 aug salīdzinoši labi, līdzīgi hibrīdapsu kloniem, arī tam raksturīgi, ka maksimālais jauno dzinumu skaits veidojas BAP koncentrācijā 0,4 mg/l (WPM, BTM) un 0,6 mg/l (GD). Barotnēs ½ MS un AC nav izteikta maksimuma. Palielinot BAP koncentrāciju virs 0,5 mg/l un IBA 0,1 mg/l, palielinās multiplikācijas koeficients un vienlaikus arī rezultātu izkliede un atšķirības starp kloniem: konkrētās vērtības ir atkarīgas no klonu īpatnībām. Jāatzīmē, ka klonu nr.23 pavairošanās intensitāte samazinās, īpaši barotnēs ½ MS un GD, bet tajā pašā laikā grūti pavairojamo triploīdu klonu C1 un R1, kā arī nr.44 pavairošanas intensitāte palielinās. Acīmredzot klonu reakciju nenosaka ploīditāte, bet iekšējo, endogēno fitohormonu līmenis, kas mijiedarbojas ar barotnes sastāvdaļām. Iespējams, ka triploīdo apšu kloniem C1 un R1 ir paaugstināts endogēno fitohormonu līmenis,

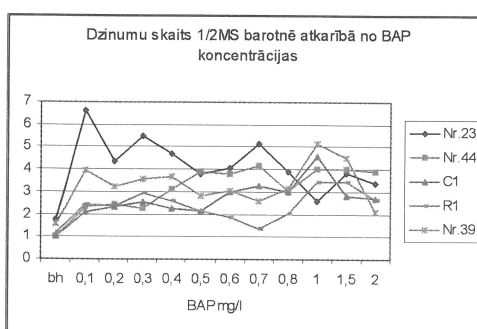
kas bremzē augšanu *in vitro*. Palielinot BAP virs 2-3 mg/l, dzinumu skaits būtiski samazinās: vērojamas vitrifikācijas pazīmes, nekrotiski plankumi uz lapām, kallusa veidošanās dzinuma bazālajā daļā, kā arī ap lapām un pašu dzinumu, kas saskaras ar barotni. Bieži barotnē iestādītais dzinums vispār neaug garumā vai

veido ap 1mm garus, neattīstītus sāndzinumus. BAP koncentrācija virs 2 mg/l vērtējama kā tuva toksiskai. Pavairošanai *in vitro* lietderīgi izmantot barotnes ar vismazāko koncentrāciju, kas ļauj ilgstoši kultivēt augus bez negatīvām blakusparādībām, novēršot pastiprinātu kallusa augšanu.



3. attēls. Dažādas izcelsmes apšu klonu dzinumu garums *in vitro* standartbarotnē 1/2 MS atkarībā no BAP koncentrācijas.

Figure 3. The height of young shoots in growth media 1/2 MS with different BAP concentrations.



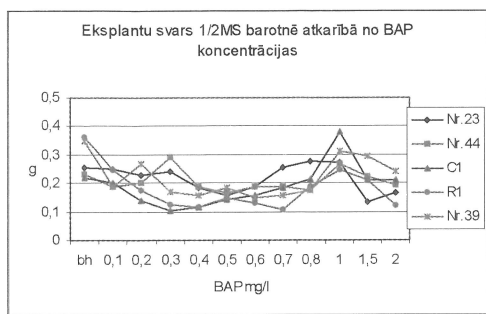
4. attēls. Dažādas izcelsmes apšu klonu dzinumu skaita izmaiņas *in vitro* barotnē 1/2MS atkarībā no BAP koncentrācijas.

Figure 4. The number of young shoots in growth media 1/2 MS with different BAP concentrations.

Viena audzēšanas cikla laikā nelabvēlīgā fitohormonu ietekme izpaužas salīdzinoši maz, bet ilgstoša apšu dzinumu kultivēšana barotnēs ar BAP virs 0,5 mg/l nav pieļaujama. Multiplikācijas koeficienta palielināšanai kloniem, kas vāji vairojas *in vitro*, var rekomendēt t.s. "šūpošanu" – periodiski nomaina barotni ar augstu BAP koncentrāciju (0,5-0,6 mg/l), kur veidojas daudzi sīki dzinumi, ar bezhormonu barotni vai barotni ar BAP 0,05-0,1mg/l, kas kalpo dzinumu elongācijai.

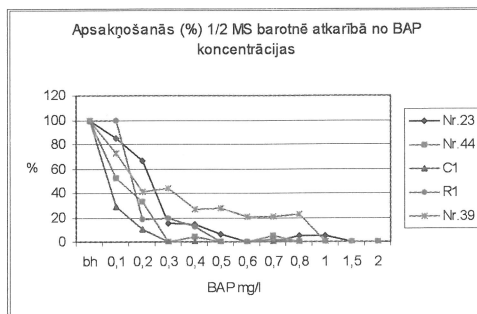
Turpmākā kultūras izmantošanā liela nozīme ir dzinumu garumam. Pavairošanai

izmantojamo dzinumu optimālais garums ir 0,5-1 cm, garākus dzinumus var sadalīt posmos ar vienu vai diviem pumpuriem, bet apsākšanai un aklimatizācijai nepieciešami 1-2 cm gari dzinumi, jo tie vieglāk pārcieš krasu apstākļu maiņu un ātrāk veido spēcīgu sakņu sistēmu, īpaši, ja arī apsākšana veikta *ex vitro*. Eksplanta svars vislielākais ir bezhormonu barotnēs, jo tajās augs veido salīdzinoši lielas lapas, kā arī 2-4 sazarotas saknes. Palielinot BAP koncentrāciju, eksplanta svars, līdzīgi kā dzinumu skaits, izmainās nedaudz. Dzinumu garums, skaits un kopējais eksplanta svars ir savstarpēji saistīti lielumi. Atkarībā no barotņu



5. attēls. Dažādas izcelsmes apšu klonu *in vitro* eksplantu svars barotnē 1/2 MS atkarībā no BAP koncentrācijas.

Figure 5. The weight of explants in growth medium 1/2 MS with different BAP concentrations.



6. attēls. Dažādas izcelsmes apšu klonu dzinumu spontāna apsākšanās *in vitro* 1/2 MS barotnē atkarībā no BAP koncentrācijas.

Figure 6. The rooting ability (%) in growth medium 1/2 MS with different BAP concentration.

sastāva mainās proporcijas starp dzinumu skaitu un garumu – palielinoties dzinumu kopējam skaitam, samazinās vidējais dzinuma garums un arī eksplanta svars. BAP koncentrāciju paaugstinot, eksplanta svars nedaudz palielinās un maksimālo vērtību sasniedz barotnēs ar BAP 1-2 mg/l, kur pastiprināti veidojas kalluss (5.att).

Apšu dzinumu kultūras salīdzinoši viegli veido saknes bezhormonu barotnēs un pat pavairošanas barotnēs ar citokinīnu (BAP) piedevu. Rizogēnēzes indukcijas etapā izšķirošā loma ir augšanas regulatoru savstarpējai bilancei. Parasti nepieciešams neliels citokinīnu un relatīvi liels augsīnu (IBA) daudzums. Pavairošanas barotnēs visbiežāk šī proporcija ir pretēja – arī apšu klonu barotnē multiplikāciju inducējošais citokinīns ir BAP, augsīns IBA pievienots 0,05-0,1 mg/l. Svarīga nozīme ir endogēno fitohormonu līmenim un iepriekšējo kultivēšanas etapu ietekmei. Tā kā visi apšu kloni ir ilgstoši kultivēti *in vitro* pirms šī pētījuma uzsākšanas, tiem raksturīgs t.s. juvenilizācijas efekts, kas izpaužas kā ļoti laba spēja apsāknoties (6.att).

Apšu klonu dzinumi visās pārbaudītajās bezhormonu barotnēs apsākņojušies 100%, veidojuši 2-4 labi attīstītas, sazarotas saknes. Apsākņošanās notiek 10-12 dienās un turpmākajā kultivēšanas periodā (kopumā 4 nedēļas) saknes aug, sasniedzot 5-10 cm garumu. Sakņu veidošanas spēja ir apgriezti proporcionāla BAP koncentrācijai barotnē. Multiplikācijas barotnēs, kas satur 0,2-0,3 mg/l BAP, strauji samazinās apsākņošanās procents un sakņu skaits, bet, ja dzinums apsākņojies, vienlaicīgi notiek gan multiplikācija, gan sakņu augšana. Sevišķi raksturīgi tas ir kloniem nr.23 un nr.39, savukārt C1 un nr.44 BAP klātbūtnē saknes veido salīdzinoši sliktāk. Šādas atšķirības sakņu iniciācijas un attīstības procesā varētu skaidrot ar ģenētiski noteiktām endogēno fitohormonu proporcijām augā. Tā kā augsīni tiek sintezēti galotnē, bet citokinīni saknēs, mainās vielu līdzsvars augā, kas ietekmē tā turpmāko attīstību.

Secinājumi

1. Triploīdo apšu un hibrīdapšu kloni audu kultūrā *in vitro* pielāgojas plašam barotņu sastāva diapazonam. Optimālā minerālā pamatbarotne ir WPM, piemērotas arī BTM un ½ MS. Barotne GD apšu klonu kultivēšanai *in vitro* nav izmantojama.
2. Dažādas izcelsmes apšu klonu reakciju uz atšķirīga sastāva barotnēm *in vitro* nosaka klona īpatnības.
3. Barotnes ar zemu fitohormonu koncentrāciju (BAP 0,2 mg/l, IBA 0,01 mg/l) piemērotas ilgstošai klonu kultivēšanai *in vitro*.
4. Palielinot BAP koncentrāciju barotnē, palielinās multiplikācijas koeficients, maksimumu sasniedzot barotnēs ar BAP 0,5-0,6 mg/l. BAP koncentrācija virs 1,5-2 mg/l augšanu ietekmē negatīvi.
5. Grūti pavairojamu apšu klonu kultūrai *in vitro* vēlams izmantot barotnes ar zemu fitohormonu koncentrāciju (BAP 0,1-0,2 mg/l, IBA 0,01 mg/l), periodiski tās nomainot ar lielākas koncentrācijas barotnēm (BAP 0,5 mg/l, IBA 0,05 mg/l).

Darbs veikts, pateicoties Meža attīstības fonda finansējumam (līgums 150405/C103).

Literatūra

- Altman A., Alegrand T., Pelah D., Tzfira T., Vinocur B., Wang W., Yarnitzky O.** 1996. Molecular Biology of Drought Tolerance and Transformation of *Populus* and *Pinus* at the Hebrew University of Jerusalem. Forest Tree Genome Research Updates. Vol.3, Nr.2: 5-7.
- Ahuja M.R.** 1983. Somatic Cell Differentiation and Rapid Clonal Propagation of Aspen. *Silvae Genetica* 32, 3-4: 131-135.
- Ahuja M.R.** 1984. Short Note: A Commercially Feasible Micropropagation Method for Aspen. *Silvae Genetica* 33, 4-5: 174-176.
- Ahuja M.R.** 1986. Aspen. In: Handbook of plant cell culture. Vol.4. (ed by David A.Evans), New York, pp.626-651.
- Ahuja M.R.** 1987. *In vitro* propagation of poplar and aspen. In: Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol.3 (ed. by J.M.Bonga and Don J.Durzan), Martinus Nijhoff Publishers, pp. 207-223.
- Ahuja M.R., Krusche D., Melchior G.H.** 1988. Determination of plantlet regeneration capacity of selected aspen clones *in vitro*. In: Somatic Cell Genetics of Woody Plants. (ed. By Ahuja M.R.), Kluwer Academic Publ., pp.127-135.
- Barocka K.H., Baus M., Lontke E., Sievert F.** 1985. Tissue Culture as a Tool for *in vitro*-Mass-Propagation of Aspen. *Z.Pflanzenzüchtg.* 94: 340-343.
- Bonga J.M.** 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation. In: Tissue Culture in Forestry (ed.by J.M.Bonga and Don J.Durzan). Martinus Nijhoff/ Dr.W.Junk Publ., The Hague, pp.387-412.
- Chalupa V.** 1987. European hardwoods. In: Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol.3 (ed. by J.M.Bonga and Don J.Durzan), Martinus Nijhoff Publ., pp.224-246.
- Douglas G.C.** 1984. Formation of Adventitious Buds in Stem Internodes of *Populus* spp. Cultured *in vitro* on Basal Medium: Influence of Endogenous Properties of Explants. *J.Plant Physiol.* Vol.116: 313-321.
- Douglas G.C.** 1989. Poplar (*Populus* spp.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees II. (ed by Y.P.S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg., pp.301-323.
- Dubova I.** 1995. Ātraudzīgu apšu hibrīdu pavairošana *in vitro*. *Mežzinātne*. 5(38)'95 : 39-46.
- 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, Tissue and Organ Culture*. 38:65-67.
- Kang J-M., Kojima K., Ide Y., Sasaki S.** 1996. Plant Regeneration from Leaf Protoplasts of *Populus euphratica*. *J.For.Res.*1(2): 99-102.
- Kuusiene S., Gradeckas A.** 2004. *In vitro* plant regeneration and acclimatization of aspen hybrids (*Populus tremuloides* x *Populus tremula*). Plant tissue culture: from theory to practice. Int.Conf.of Baltic States. May 27-28, 2004, Salaspils, Latvia.
- Lee-Stadelmann O.Y., Lee S.W., Hackett W.P., Read P.E.** 1989. The formation of adventitious buds *in vitro* on micro-cross sections of hybrid *Populus* leaf midveins. *Plant Science*, 61: 263-272.

- Mala J., Michalova M.** 1993. Transformace hybridu osiku (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*) Agrobacterium tumefaciens. Práce VÚHLM. pp.67-73
- Машкина О.С., Табацкая Т.М., Бурдаева Л.М., Исаков Ю.Н.** 2001. Методы культуры ткани в лесной генетике и селекции. Лесная генетика и селекция на рубеже тысячелетий. Тез. докл. научно-практической конференции. Воронеж: НИИЛГиС, 2001, с.18.
- McCown B.H.** 1989. Birch (*Betula spp.*). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 5. Trees II. (ed. by Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.324-341.
- Naujoks G., Ewald D., Matschke J.** 1987. In - vitro - Kultivierung von *Populus spec.* Beiträge für die Forstwirtschaft. 21 (3): 102-106.
- Rutledge C.B., Douglas G.C.** 1988. Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of poplar *in vitro*. Physiol.Plant. 72: 367-373
- Saito A.** 1980. Medium for Shoot Formation from Somatic Callus Tissues in *Populus*. J.Jap.For.Soc. Vol.62(7): 270-272.
- Simola L.K.** 1985. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula f.purpurea*. Scientia Horticulturae. Vol.26(1): 77-86.
- Staniene G., Gradeckas A.** 2001. *In vitro* propagation of *Populus tremuloides* Michaux x *P.tremula* L. hybrids. Proc. Latvian Acad. of Sci., Section B, Vol.55, No. 5/6: 321-233.
- Stoehr M.U., Zsuffa L.** 1990. Induction of haploids in *Populus maximowiczii* via embryogenic callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 23: 49-58.
- Sung Ho Son, Hall R.B.** 1990. Multiple shoot regeneration from root organ cultures of *Populus alba* x *P.grandilenta*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20: 53-57.
- Тропа М.** 1990. Микроклональное размножение осины. В кн.: Роль селекции в улучшении латвийских лесов. Рига, «Зинатне», с. 93-97.
- Welander M., Jansson E., Lindqvist H.** 1989. In vitro propagation of *Populus x wilsocarpa* – a hybrid of ornamental value. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 18: 209-219.