

Embriogēnā kallusa attīstības etapa un kultivācijas apstākļu ietekme uz somatisko embriju nobriešanas efektivitāti

M. Fiļipovičs, LVMI "Silava"

Kopsavilkums: Somatiskā embriogēnēze ir diezgan jauna un perspektīva augu audu kultūru metode ar plašām praktiskās pielietojšanas iespējām meža koku, t. sk. parastās egles, kā arī lauksaimnieciski nozīmīgu augu veģetatīvajā pavairošanā un selekcijā, kas ļauj no eksplanta somatiskajām šūnām īpašos *in vitro* apstākļos iegūt embrijus un pēc tam jaunus augus. Latvijas mežsaimniecībā šīs inovatīvās metodes ieviešana būtiski veicinātu turpmākos parastās egles selekcijas un apmežošanas darbus. Somatiskajā embriogēnēzē izšķir vairākus kultivēšanas etapus un katram no tiem ir savs specifisks uzdevums. Embriogēnā kallusa proliferācijai nepieciešamo fitohormonu eliminēšana un turpmāko somatisko embriju nobriešanas stimulēšana ar abscizskābi ir viens no kritiskākajiem kultivācijas posmiem, kas būtiski ietekmē metodes pielietojšanas efektivitāti (von Arnolds *et al.* 2005).

Šī darba galvenais uzdevums – izstrādāt kultivēšanas protokolus atsevišķiem parastās egles somatiskās embriogēnēzes posmiem, lai nodrošinātu efektīvu šūnu attīstības pāreju no aktīvas proliferācijas uz turpmāko somatisko embriju nobriešanu. Kallusu kultivēšanai un somatisko embriju nobriešanai izmantotas barotnes un kultivēšanas apstākļi, kādi galvenokārt pielietoti citu autoru līdzīgos pētījumos. Rezultātā trijām no piecām kallusu līnijām iegūti nobrieduši somatiskie embriji, kā arī apstiprinājās hipotēze, ka pastāv būtiska, pozitīva korelācija starp embriogēno kallusu veidojošo šūnu agregātu jeb proembriogēno masu noteiktu attīstības etapu un somatisko embriju nobriešanas efektivitāti (uz vienu kallusa gramu iegūto somatisko embriju skaits). Otrkārt, secināts, ka proliferācijas apturēšanas etapa kultivēšanas ilgums un barotnes sastāvs būtiski ietekmē somatisko embriju nobriešanas efektivitāti. Iegūtie rezultāti izmantojami turpmākajiem parastās egles somatiskās embriogēnēzes metodes optimizēšanas pētījumiem.

Nozīmīgākie vārdi: somatiskais embrijs, proembriogēnā masa, embriogēnais kalluss, proliferācija, proliferācijas pārtraukšanas etaps, abscizskābe, aktivētā ogle, somatisko embriju nobriešanas efektivitāte.

...

M. Filipovičs, LFRI „Silava” Developmental stage of embryogenic callus and cultivation conditions affect efficiency of somatic embryo maturation.

Abstract: Somatic embryogenesis is a plant tissue culture method where embryos are developed from somatic cells of explant in specific *in vitro* conditions. This is a modern and promising method with a high potential of practical application in propagation and genetic improvement of many forest tree species, including Norway spruce and agricultural crops. In Latvian forestry it is a novel method, and the introduction of somatic embryogenesis will facilitate further genetic improvement of spruce for uses in afforestation programs. Somatic embryogenesis comprises a number of steps having different and specific aims. Among the critical points, which affect the efficiency of this method, are the elimination of phytohormones required for the proliferation of embryogenic callus and the stimulation of maturation of somatic embryos by abscisic acid (von Arnold et al. 2005).

Main goal of this work was to develop a cultivation procedure, consisting of several stages, for propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. This can be achieved by effectively switching cell development from proliferation to further development of somatic embryos. The composition of medium and the cultivation conditions for embryogenic callus proliferation and maturation of somatic embryos have been developed by other researchers in similar studies. Somatic embryos were obtained for three calli lines out of five. Results confirm the hypothesis that there is significant and positive correlation between the developmental stage of proembryogenic mass and the maturation efficiency of somatic embryos (obtained number of somatic embryos per gram of initial callus). It was also concluded that the cultivation time and the composition of medium with no plant growth regulators significantly affect prematuration process and the maturation efficiency of somatic embryos. The data obtained will be useful for further optimization of somatic embryogenesis method for *in vitro* propagation of Norway spruce.

Key words: somatic embryo, proembryogenic mass, embryogenic callus, proliferation, prematuration, abscisic acid, activated charcoal, efficiency of maturation of somatic embryos.

...

М. Филипович. Влияние этапа развития эмбриогенного каллуса и условий культивирования на формирование соматических эмбрионов.

Резюме: Соматический эмбриогенез является одним из методов культур клеток и тканей растений. Данный метод основывается на возможности в

специфических условиях *in vitro* индуцировать в соматических клетках экспланта развитие эмбрионов и потом получить новые растения. Этот перспективный метод имеет широкий спектр практического применения в селекции и вегетативном размножении сельскохозяйственных растений и древесных пород, в том числе ели обыкновенной. Внедрение данного метода в лесном хозяйстве Латвии способствовало бы дальнейшему развитию селекции и культивированию ели обыкновенной. Соматический эмбриогенез состоит из нескольких этапов культивирования, каждый из которых имеет свое специфическое назначение. Удаление фитогормонов, которые способствуют пролиферации эмбриогенного каллуса, и стимулирование дальнейшего развития соматических эмбрионов абсцизовой кислотой является одним из ключевых этапов культивирования, который существенно влияет на эффективность данного метода (von Arnolds *et al.* 2005).

Главная задача настоящей работы – разработать протокол культивирования ели обыкновенной по отдельным этапам для обеспечения эффективного перехода развития клеток от пролиферации к дальнейшему формированию соматических эмбрионов. Используемые в эксперименте питательная среда и условия культивирования базируются главным образом на литературных данных исследований других авторов. В результате проведенных опытов, в трех из пяти линий каллусов сформировались соматические эмбрионы. Подтвердилась гипотеза о позитивной корреляции между этапом развития эмбриогенного каллуса составляющих клеток и эффективностью формирования соматических эмбрионов (количество полученных соматических эмбрионов соотносительно массе одного грамма начального каллуса). Также выяснено, что продолжительность культивирования для остановки пролиферации и состав используемой среды (на данном этапе) существенно влияют на эффективность формирования соматических эмбрионов. Полученные результаты используются в дальнейших исследованиях с целью оптимизации соматического эмбриогенеза ели обыкновенной.

Ключевые слова: соматический эмбрион, проэмбриогенная масса, эмбриогенный каллус, пролиферация, этап остановки пролиферации, абсцизовая кислота, активированный уголь, эффективность формирования соматических эмбрионов.

Ievads

Somatiskās embriogēnēzes izmantošana parastās egles veģetatīvai pavairošanai ir daudzpakāpju process, kas ietver sevī septiņus kultivēšanas etapus: embriogēnā kallusa iniciāciju, proliferāciju, agrā embrija attīstības stadiju (pirmsnobriešanu), somatiskā embrija nobriešanu, desikāciju, sakņu augšanu un *ex vitro* izstādīšanu. Rezultātā tiek iegūts liels daudzums jaunu augu, kas ir ģenētiski identiski ievadītajam eksplantam (von Arnold *et al.* 2002).

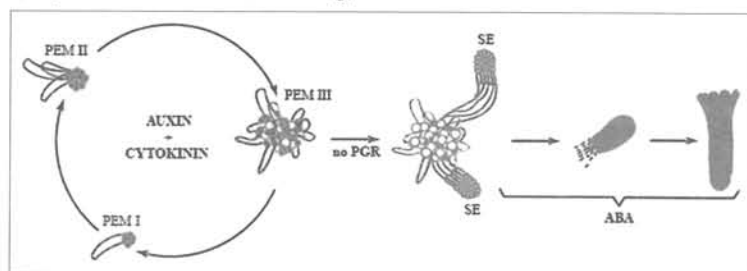
Somatiskās embriogēnēzes procesam izdalāmas divas galvenās fāzes. Pirmā ir saistīta ar kallusu veidojošo šūnu sakopojumu jeb proembriogēno masu, proliferāciju un attīstību. Šajā fāzē nekad neveidojas nobriedušie somatiskie embriji. Otrajā fāzē no proembriogēnās masas attīstās nobriedušie somatiskie embriji: kopumā šī fāze ir līdzīga zigotisko embriju ontogēnei intaktā augā (Singh 1978 pēc von Arnold *et al.* 2005).

Embriogēno kallusu veido proembriogēnā masa (turpmāk tekstā PEM, no angļu

proembryogenic mass), tā sastāv no atsevišķiem šūnu agregātiem, kas būtībā ir somatisko embriju aizmetņi. Katru atsevišķo agregātu veido divu tipu šūnas:

- a) izodiametriskas – cieši izvietojušās šūnas ar blīvu citoplazmu un lieliem kodoliem, tās veido agregāta “galvas” daļu, no kuras pēc tam attīstās somatiskie embriji;
- b) “astes” daļu veido suspensora šūnas – iegarenas šūnas ar lielām vakuolām (Filonova *et al.* 2000a).

Embriogēnā kallusa proliferācijas posmā izšķir trīs PEM attīstības etapus (1. attēls.). Šie etapi var cikliski sekot viens otram, ja kalluss regulāri tiek subkultivēts. Optimālu kallusa proliferāciju nodrošina augsni un citokinīni; visplašāk izmanto 2,4-D (2,4-dihlorofenoksietilskābe) un BA (benzilaminopurīns) kombināciju (Filonova *et al.* 2000a). Atzīmējams, ka citokinīni nodrošina šūnu dalīšanos (proliferāciju), bet augsni – šūnu specifisko attīstību (embriogēnēzes efekts) (Bellarosa *et al.* 1992).



1. attēls. Parastās egles somatiskās embriogēnēzes shematiskais attēlojums (attēls no Filonova *et al.* 2000a), mērogs nav ievērots. Embriogēno kallusu veido proembriogēnā masa (PEM I, PEM II un PEM III), kas attīstās secīgi un cikliski, bet proliferācijas barotnē – nekad līdz nobriedušiem somatiskiem embrijiem (von Arnold *et al.* 2005). Saīsinājumi: ABS – abscizskābe; PGR – fitohormoni (no angļu valodas ‘plant growth regulators’); SE – somatiskais embrijs.

Fig. 1. A schematic representation of the developmental pathway of somatic embryogenesis in Norway spruce (adapted from Filonova *et al.* 2000a), not drawn to scale. Embryogenic callus consist of proembryogenic masses (PEM I, PEM II and PEM III) which develop sequentially and cyclically, but on proliferation medium never develop into somatic embryos (von Arnold *et al.* 2005). Abbreviations: ABS – abscisic acid; PGR – plant growth regulators; SE – somatic embryo.

Svarīgi atzīmēt, ka turpmākā somatisko embriju attīstība notiek tikai no PEM III šūnu agregātiem, jo šajā darbā PEM III procentuālais saturs tiek izmantots kā marķieris embriogēnā kallusa attīstības fāzes noteikšanai.

Kalluss var būt embriogēns un neembriogēns, attiecīgi to apzīmē kā A un B tipa. No A tipa kallusa abscizskābi (turpmāk tekstā – ABS) saturošā barotnē attīstās morfoloģiski normāli, nobrieduši somatiskie embriji, bet no B tipa kallusa tādos pašos apstākļos somatiskie embriji neattīstās vai arī veidojas ar morfoloģiskiem defektiem un turpmāk tiem neattīstās saknes (Filonova *et al.* 2000a).

Pārejas stadija PEM attīstībā no proliferācijas uz somatisko embriju nobriešanu ir viens no svarīgākajiem etapiem parastās egles somatiskajā embriogēnēzē, kuru daudzas labi proliferējošas kallusa līnijas nespēj realizēt (Filonova *et al.* 2002). Mikroskopisko un citu pētījumu rezultātā noteikti trīs svarīgākie priekšnosacījumi efektīvai pārejas stadijai PEM attīstībā uz somatisko embriju nobriešanu:

- fizioloģisko procesu izmaiņas, kas izraisa proliferācijas apstāšanos un turpmāko somatisko embriju nobriešanu, notiek īsā laika periodā (aptuveni 24 h) – uzreiz pēc fitohormonu iedarbības pārtraukšanas;
- ABS neizraisa proliferācijas apstāšanos, tādēļ kallusa kultivēšana ABS saturošā barotnē tūlīt pēc proliferācijas neinducēs turpmākos somatisko embriju nobriešanas procesus;
- no PEM III izveidojušos somatiskos embrijus agrīnajā attīstības fāzē var kultivēt bezhormonu barotnē vismaz septiņas dienas, saglabājot embriju jutību pret ABS, kas nepieciešama turpmāko nobriešanas procesau inducēšanai (Bozhkov *et al.* 2002).

No iepriekšminētā izriet, ka somatisko embriju nobriešanas procesu inducēšanai jānovērš augsīnu un citokinīnu iedarbība, kas izdarāms embriogēno kallusu dažas dienas kultivējot bezhormonu barotnē. Bozhkov *et al.* (2002) veiktie pētījumi apliecināja, ka tādā veidā parastās egles kultūrās ir iespējams panākt 5–10 kārtīgu somatisko embriju pieaugumu. Tātad, pārejas stadija PEM attīstībā no cikliskās proliferācijas uz somatisko embriju turpmākajiem nobriešanas procesiem ir viens no kritiskajiem punktiem, kas raksturo parastās egles somatiskās embriogēnēzes efektivitāti (Stasolla *et al.* 2001).

Šī darba galvenie uzdevumi – realizēt somatisko embriju nobriešanas etapu piecām kallusa līnijām, noteikt, kuras no tām ir embriogēnas; pārbaudīt vai pastāv būtiska, pozitīva korelācija starp kallusu veidojošo šūnu agregātu – proembriogēno masu trešo attīstības etapu un somatisko embriju nobriešanas efektivitāti; izvērtēt proliferācijas un tās pārtraukšanas etapu kultivēšanas ilguma un barotnes sastāva ietekmi uz nobriešanas efektivitāti.

Materiāls un metodika

Pētnieciskajā darbā izmantotas piecas kallusa līnijas, kas turpmāk apzīmētas ar numuriem no viens līdz pieci:

Nr.1 – Wisła 2; Nr.2 – 4359-1; Nr.3 – 6059-2; Nr.4 – 6062-1; Nr.5 – Wisła 48h 3.

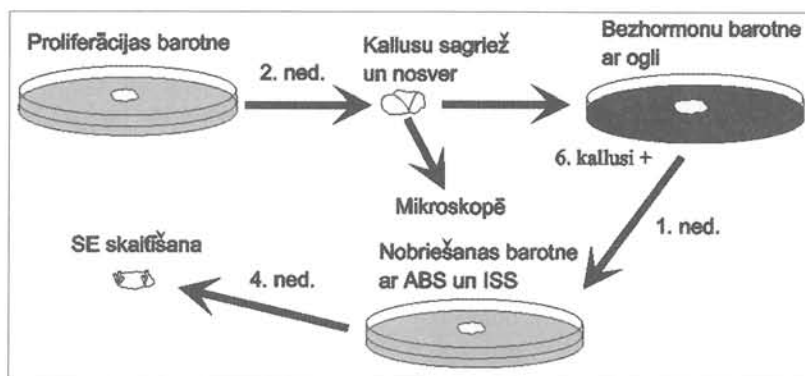
Kallusa līnijas Nr.1 un Nr.5 iegūtas no atlasītas sēklu audzes *Ustroń* nobriedušiem zigotiskajiem embrijiem; Nr.3 un Nr.4 - no sēklu plantācijas *Górny Sanok* nenobriedušiem zigotiskajiem embrijiem, bet Nr.2 - no sēklu plantācijas *Stupsiany* nenobriedušiem zigotiskajiem embrijiem. Iepriekš pieminētās sēklu plantācijas un atlasītā sēklu audze atrodas Polijas ZA daļā, *Krosno* un *Wisła* virsmežniecībā. Embriogēnā kallusa iniciāciju veica Varšavas

Mežzinātnes institūta Meža koku ģenētikas un fizioloģijas nodaļā, Dr. biol. Krystyna Szczygieł vadībā no 2006. gada augusta līdz oktobrim. Detalizēta kultūras uzsākšanas metodika un iegūtie rezultāti publicēti zinātnisko rakstu krājumā *Mežzinātne* Nr. 15 (48)' 2006 (Filipovičs u. c. 2006). Visas embriogēnā kallusa līnijas 2006. gada novembra sākumā tika atvestas uz Latviju, kur tās kultivēja proliferācijas barotnē no novembra līdz 2007. gada aprīlim; subkultivācijas periods - divas nedēļas.

Eksperimentālā secība:

Kallusa līnijas Nr.1, Nr.2 un Nr.3 (2. att.) kultivēja proliferācijas barotnē divas nedēļas (pēdējā subkultivācija), pēc tam

kallusus sagrieza (atkarībā no izmēra), sterilos apstākļos nosvērā uz svariem (Kern PLS 360-3, ar precizitāti 0,1 mg) un novietoja proliferācijas procesa pārtraukšanas barotnē, kas saturēja aktivēto ogli (10 g l^{-1}). Nelielu daļu no katra kallusa atstāja proliferācijas barotnē un pēc tam izmantoja mikroskopēšanai (PEM III procentuālā daudzuma noteikšanai). Proliferācijas pārtraukšanas barotnē kallusus kultivēja vienu nedēļu, pēc tam tos ievietoja somatisko embriju nobriešanas barotnē, kur kultivēja četras nedēļas. Pēc tam tika saskaitīti nobriedušie somatiskie embriji un veikti nepieciešamie aprēķini. Katrai līnijai izmantoja sešus atkātojumus, t. i. kultivēja sešus kallusus, katru atsevišķā Petri traukā un papildus rezervē – vēl divus kallusus.

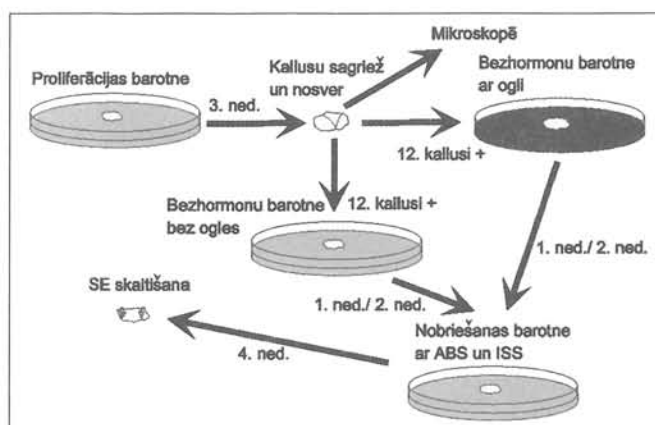


2. attēls. Eksperimentālās secības attēlojums kallusa līnijām Nr.1, Nr.2 un Nr.3. Saīsinājumi: ABS – abscizskābe; ISS – indolil-3-sviestskābe; SE – somatiskais embrijs.

Fig. 2. Stages of experiment for calli Nr. 1, Nr.2 and Nr.3. Abbreviations: ABS – abscisic acid; ISS – indole-3-butyric acid; SE – somatic embryo.

Kallusa līniju Nr.4 (3. att.) kultivēja proliferācijas barotnē trīs nedēļas, pēc tam kallusus sagrieza (atkarībā no izmēra), sterilos apstākļos nosvērā uz svariem un ievietoja proliferācijas pārtraukšanas barotnē divos variantos: pirmajā – barotnē ar aktivēto

ogli 10 g l^{-1} ; otrajā – barotnē bez aktivētās ogles. Nelielu daļu no katra kallusa atstāja proliferācijas barotnē un pēc tam izmantoja mikroskopēšanai. Kultivēšanai proliferācijas pārtraukšanas barotnē arī izmantoti divi varianti: vienā kultivēšanas ilgums bija viena



3. attēls. Eksperimentālās secības attēlojums kallusa līnijai Nr.4. Saīsinājumi: ABS – abscizskābe; ISS – indolil-3-sviestskābe; SE – somatiskais embrijs.

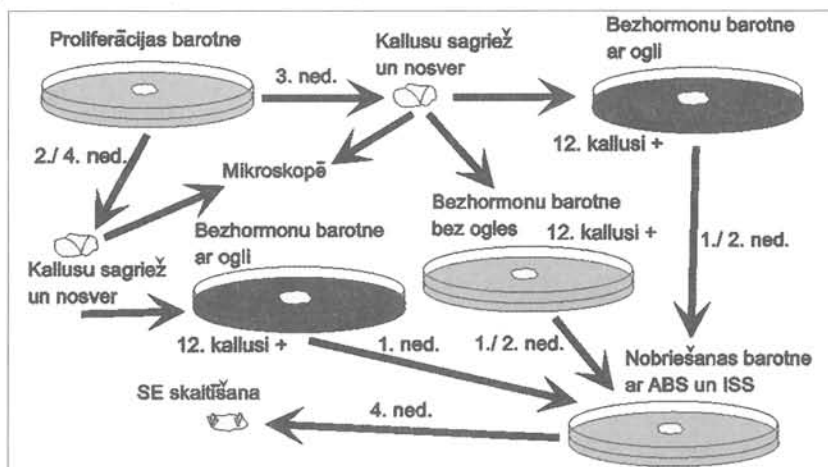
Fig. 3. Stages of experiment for callus Nr.4. Abbreviations: ABS – abscisic acid; ISS – indole-3-butyric acid; SE – somatic embryo.

nedēļa, otrā – divas nedēļas. Pēc tam kallusus ievietoja somatisko embriju nobriešanas barotnē, kur kultivēja četras nedēļas, pēc tam saskaitīja nobriedušos somatiskos embrijus un veica nepieciešamos aprēķinus. Atkārtojumu skaitu katrā variantā veidoja seši kallusi un divi rezervē, kopā 24 kallusi plus rezerve.

Barotne un kultivēšanas apstākļi

Embriogēnā kallusa kultivēšanai izmantoja Petri traukus (diametrs 90 mm) ar

barotnes daudzumu katrā aptuveni 30 – 35 ml. Barotni autoklavēja 20 min pie 1,1 atmosfēras virsspiediena 0,5 – 1,0 l traukos, pārnesa uz laminārboksu un salēja sterilos Petri traučīšos. Kultivēšanas apstākļi: 24 °C, 70 % relatīvais mitrums, tumsā. Apstākļu nemainīgumu nodrošināja klimatkamera Selecta HOTCOLD-GL. Sterilos darbus veica laminārboksā Kojair KR-130.



4. attēls. Eksperimentālās secības attēlojums kallusa līnijai Nr.5. Saīsinājumi: ABS – abscizskābe; ISS – indolil-3-sviestskābe; SE – somatiskais embrijs.

Fig. 4. Stages of experiment for callus Nr.5. Abbreviations: ABS – abscisic acid; ISS – indole-3-butyric acid; SE – somatic embryo.

1. tabula, Table 1

Somatiskās embriogēzes kultivēšanas barotnes makrosāļu un mikrosāļu sastāvs, modificēta BM (*basal medium*) barotne pēc (Gupta & Durzan 1986).

Macroelements and microelements of somatic embryogenesis cultivation medium, modified BM (basal medium) (Gupta & Durzan 1986).

	Viela	Koncentrācija mg l⁻¹
Makroelementi	NH ₄ NO ₃	275
	KNO ₃	2337
	CaCl ₂	220
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	185
	KH ₂ PO ₄	85
Dzelzs, helatējošais aģents (pēc MS)	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,85
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,25
Mikroelementi (pēc MS)	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
	H ₃ BO ₃	6,2
	KI	0,83
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025

2. tabula, Table 2

Barotņu sastāvs dažādiem somatiskās embriogēzes kultivēšanas etapiem

Medium composition for different stages of somatic embryogenesis

Vielas, šķīdumi	Koncentrācija uz 1 l barotnes			
Kultivēšanas etapi	Embriogēnā kallusa inducēšana	Proliferācija	Proliferācijas pārtraukšana	Somatisko embriju nobriešana
Makrosāļi	100 ml l ⁻¹ pagatavotā koncentrāta			
NaFeEDTA	60 % no MS			
MS mikro	60 % no MS			
Nikotīnskābe	0,25 mg l ⁻¹			
Tiamīns	0,5 mg l ⁻¹			
Piridoksīns	0,25 mg l ⁻¹			

Mezoinozīts	1000 mg l ⁻¹			
Kazeīna hidrolizāts	1000 mg l ⁻¹			
Glicīns	1 mg l ⁻¹			
Glutamīns*	450 mg l ⁻¹			
2,4-D	2 mg l ⁻¹	2 mg l ⁻¹	–	–
BAP	1 mg l ⁻¹	0,5 mg l ⁻¹	–	–
ABS*	–	–	–	10 mg l ⁻¹
ISS	–	–	–	0,2 mg l ⁻¹
Aktivēta ogle	–	–	10 g l ⁻¹ / bez**	–
Saharoze	30 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹	34 g l ⁻¹	34 g l ⁻¹
Fitoagars	4 g l ⁻¹			
pH	5,6 – 5,8			

* – vielas, kuras pievienotas pēc barotnes autoklavēšanas (filtrējot);

** – pagatavota barotne gan ar aktivēto ogli (10 g l⁻¹), gan bez tās (sk. eksperimentālo secību dažādām kallusa līnijām iepriekšējā nodaļā).

Mikroskopēšana

Embriogēnā kallusa attīstības fāzes noteikšana

Acetokarmīna šķīduma pagatavošana: 1 g karmīna kolbā ar attecies dzesinātāju ūdens vannā 1 stundas laikā izšķīdina 45 g ledus etiķskābē, kurai pievienots 55 ml destilēta ūdens, pēc tam šķīdumu nofiltrē (Паймеева 1980).

Mikroskopēšanai izmantots Leica DM 4000 B mikroskops, attēlu iegūšanai - Canon PowerShot S80 fotokamera.

Kallusa sastāva pārbaudei jeb PEM III procentuālā sastāva noteikšanai pielietota acetokarmīna iekrāsošanas metode:

- paņēma preparātu (aptuveni 1 mm diametrā), novieto uz atsevišķa priekšmetstikliņa;
- preparātam uzpilda acetokarmīna etiķskābes šķīdumu, iztur 1 min;
- skalo ar ūdeni, apsedz ar segstikliņu un aplūko zem mikroskopa ar palielinājumu 50 – 400x;

- nosaka PEM I, PEM II un PEM III katrā preparātā, ja nepieciešams, izdarot īpašas piezīmes;

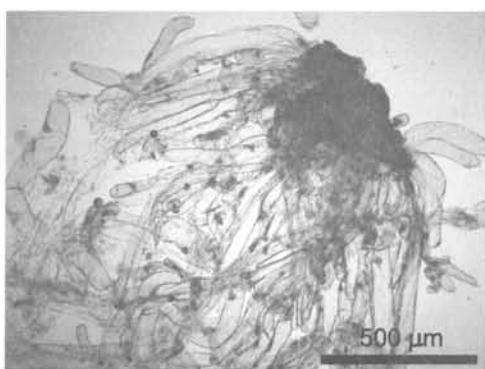
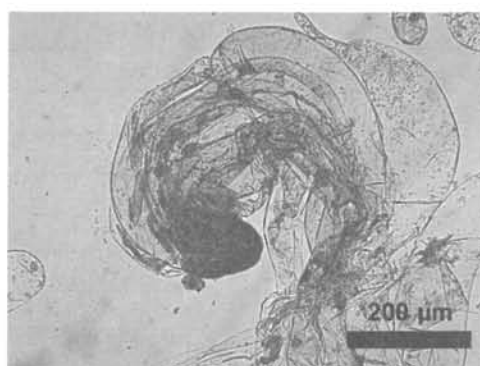
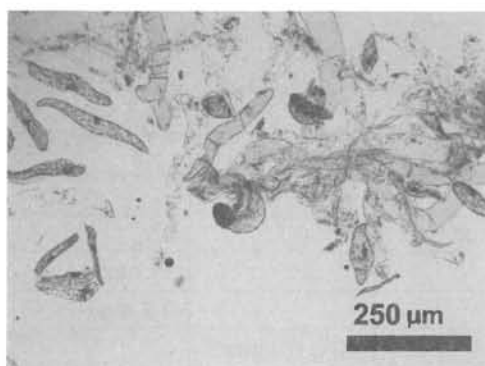
- no katra kallusa izmanto sešus preparātus – trīs no kallusa malām un trīs no kallusa virspuses.

Embriogēnā kallusa anatomiskie pētījumi

Lai kallusam noteiktu optimālo vietu PEM III procentuālā satura novērtēšanai, visām eksperimentā izmantotajām līnijām noteikts PEM sadalījums dažādās kallusa vietās. Šim nolūkam katra kallusa sānos, virspusē un vidū tika paņemti trīs preparāti (pārgriežot kallusu uz pusēm). Katras līnijas mikroskopēšana veikta ar trijiem kallusiem - pēc divu nedēļu kultivēšanas uz proliferācijas barotnes. Preparātu iekrāsošanai izmantota tā pati metodika kā embriogēnā kallusa attīstības fāzes noteikšanai (sk. iepriekšējo nodaļu).

PEM I, PEM II un PEM III atšķiršana

Kallusa sastāvā vienlaicīgi ietilpst visi trīs šūnu agregāti, kuru atšķiršanai nepieciešams



5. attēls. Kallusu veidojošo PEM I (proembriogēnā masa), PEM II un PEM III šūnu agregāti, kuru galvenās atšķirīgās pazīmes: šūnu agregātu kopējais izmērs, šūnu skaits un polaritāte. (Iekrāsots ar 1 % acetokarmīnu).

Fig. 5. Callus consist of cell aggregates PEM I (proembryogenic mass), PEM II and PEM III. Main differences are: total size of cell aggregates, number of cells within one aggregate and polarity. (Stained with 1 % acetocarmine).

ņemt vērā šādus parametrus (5. att.):

- PEM I – galvas daļu veido viena vai nedaudzas (līdz piecām) blīvi savietotas šūnas; astes daļā arī tikai viena līdz trīs suspensora šūnas;
- PEM II – gan galvas, gan astes daļā šūnu skaits ir ievērojami lielāks, bet saglabājas polaritāte;
- PEM III – salīdzinājumā ar PEM II, pieaudzis šūnu skaits abās daļās, bet zudusi polaritāte (ne vienmēr), t. i. suspensora šūnas izvietojušās dažādos virzienos (Filonova et al. 2000a).

Somatisko embriju skaitīšana, somatisko embriju nobriešanas efektivitātes u. c. rādītāju aprēķināšana

Pēc četrus nedēļas kultivēšanas nobriešanas barotnē katram kallusam saskaitīti somatiskie embriji: šo skaitli izdalot ar sākotnējo kallusa masu, noteikta somatisko embriju nobriešanas

efektivitāte (Becwar et al. 1987).

$$SE = NE / m, \text{ kur}$$

SE – somatisko embriju nobriešanas efektivitāte;

NE – nobriedušo embriju skaits;

m – kallusa sākotnējā masa;

Somatisko embriju morfoloģisko defektu raksturīgākās pazīmes:

- vitrificēts un / vai uzbriedis hipokotils;
- nenormāli izveidojušās diglāpas (Roberts et al. 1991);
- citas neraksturīgas īpašības: daļēja nekroze, izteikti atšķirīga forma u.tml.

Katram kallusam noteikts PEM III procentuālais saturs – mikroskopējot pierakstīts dažādu šūnu agregātu (PEM I – PEM III) skaits katrā paraugā, pēc tam PEM III skaits izdalīts

ar kopējo šūnu agregātu skaitu.

PEM III % = PEM III / n, kur

PEM III % – PEM III procentuālais saturs konkrētajā kallusā;

PEM III – PEM III skaits;

n – visu PEM (I – III) šūnu agregātu skaits.

Statistiskie aprēķini - PEM III procentuālā satura atšķirības starp kallusa līnijām (vai variantiem), korelācija starp PEM III procentuālo saturu un somatisko embriju nobriešanas efektivitāti, kā arī kultivēšanas laika un proliferācijas pārtraukšanas barotnes sastāva (ar aktivēto ogli vai bez) ietekmes

analīze ANOVA - veikti ar Microsoft Excel 2003 un STATGRAPHICS Centurion XV, Version 15.2.00. programmu palīdzību.

Rezultāti

Embriogēnās, neembriogēnās kallusa līnijas un somatisko embriju nobriešanas efektivitāte

Trešajā tabulā apkopoti rezultāti - somatisko embriju nobriešanas efektivitātes rādītāju (izklīede un vidējais aritmētiskais) sadalījums visām kallusa līnijām dažādos eksperimentālajos variantos.

3. tabula, Table 3

Eksperimentu gaitā iegūtie somatisko embriju nobriešanas efektivitātes rezultāti piecām kallusa līnijām. SE nobriešanas efektivitāte – nobriedušu somatisko embriju skaits uz sākotnējā kallusa vienu gramu.

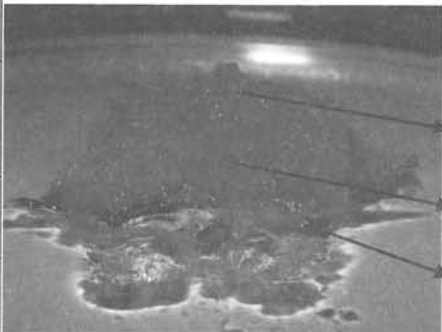
Results of somatic embryo maturation efficiency for five calli lines. SE maturation efficiency – number of matured somatic embryo per gram of initial callus.

Kallusa līnija	Kultivēšanas ilgums proliferācijas barotnē	Proliferācijas pārtraukšanas barotne		SE nobriešanas efektivitātes rādītāju izklīedes robežas	SE nobriešanas efektivitātes rādītāju vidējais aritmētiskais ($\pm$ standartklūda)
		Kultivēšanas ilgums	Aktivētā ogle		
Nr.1	2 nedēļas	1 nedēļa	ir	104 – 603	284.1 $\pm$ 58.7
Nr.2	2 nedēļas	1 nedēļa	ir	0	0
Nr.3	2 nedēļas	1 nedēļa	ir	0	0
Nr.4	3 nedēļas	1 nedēļa	ir	101 – 185*	135.4 $\pm$ 9.8
		1 nedēļa	nav	42 – 253	134.8 $\pm$ 27.8
		2 nedēļas	ir	85 – 164*	129.5 $\pm$ 8.8
		2 nedēļas	nav	125 – 380*	281.5 $\pm$ 32.7
Nr.5	2 nedēļas	1 nedēļa	ir	0	0
	3 nedēļas	1 nedēļa	ir	0 – 134*	68.1 $\pm$ 16.4
		1 nedēļa	nav	156 – 708	415.4 $\pm$ 59.6
		2 nedēļas	ir	0 – 195*	97.9 $\pm$ 18.2
		2 nedēļas	nav	205 – 291	239.4 $\pm$ 9.4
	4 nedēļas	1 nedēļa	ir	0 – 87	61.5 $\pm$ 9.5

* – daļai vai visiem somatiskajiem embrijiem novēroti morfoloģiski defekti.

4. tabula, Table 4

PEM III šūnu agregātu izvietojums dažādās kallusa vietās
Distribution of PEM III cell aggregates in different regions of callus

Preparātu noņem- šanas vietas		Kallusa līnijas				
		Nr.1	Nr.2	Nr.3	Nr.4	Nr.5
Kallusa augšpuse		23.7	10.6	35.3	30.0	18.2
Kallusa vidus		8.9	15.4	?*	22.2	18.8
Kallusa sāni		38.1	13.8	42.1	35.7	26.9

* – šūnas slikti iekrāsojušās, kā arī grūti nosakāma PEM dažādās attīstības fāzēs, tādēļ precīzu rezultātu nav.

Mikroskopijas metodika un kallusa anatomiskā pārbaude

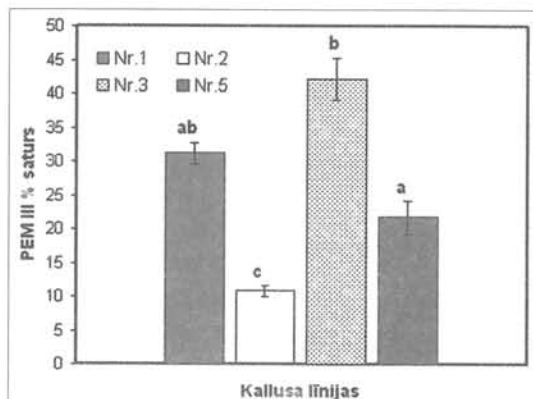
Priekšizmēģinājumos pārbaudītas vairākas krāsvielas (dažādi karmīna pagatavošanas veidi, kālija permanganāta 5% šķīdums u.c.), dažādas iekrāsošanas metodes

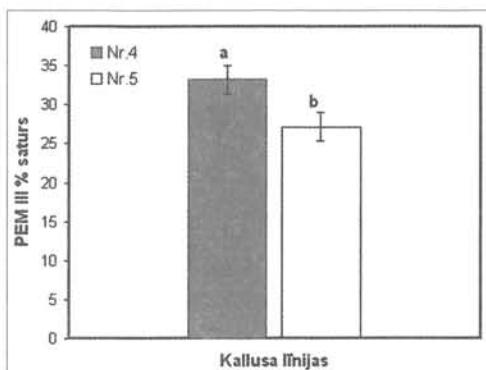
un izmantots dažādu preparātu daudzums no viena kallusa, lai atrastu optimālu, efektīvu un ne pārāk darbietilpīgu PEM noteikšanas metodi.

No ceturtās tabulas var secināt, ka PEM III procentuālais saturs vienas kallusa līnijas

6. attēls. Mikroskopijas rezultāti: PEM III procentuālais saturs kallusa līnijās Nr.1, Nr.2, Nr.3 un Nr.5 pēc divu nedēļu kultivēšanas proliferācijas barotnē. Ar dažādiem burtiem apzīmēti varianti, starp kuriem pastāv būtiskas atšķirības ($p < 0.05$). Saīsinājumi: PEM – proembriogēnā masa.

Fig. 6. PEM III percentage in calli of lines Nr.1, Nr.2, Nr.3 and Nr.5, after two weeks cultivation on proliferation medium. Letters indicate variants with significant differences ($p < 0.05$). Abbreviation: PEM – proembryogenic mass.





7. attēls. Mikroskopēšanas rezultāti: PEM III procentuālais saturs kallusa līnijās Nr.4 un Nr.5 pēc trīs nedēļu kultivēšanas proliferācijas barotnē. Ar burtiem apzīmēti varianti, starp kuriem pastāv būtiskas atšķirības ($p < 0.05$). Saīsinājumi: PEM – proembriogēnā masa.

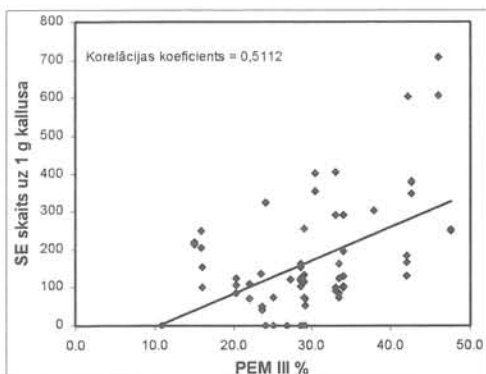
Fig. 7. PEM III percentage in calli of lines Nr.4 and Nr.5, after three weeks cultivation on proliferation medium. Letters indicate variants with significant differences ($p < 0.05$). Abbreviation: PEM – proembryogenic mass.

ietvaros variē atkarībā no preparāta ņemšanas vietas. Visbūtiskāk no pārējiem atšķirās rezultāti tajā gadījumā, kad preparāti tika ņemti no kallusa vidus.

PEM III procentuālais saturs kallusā, tā korelācija ar somatisko embriju nobriešanas efektivitāti

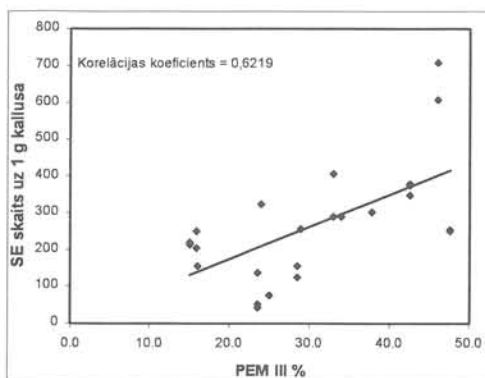
Mikroskopijas analīžu rezultātā noteikts PEM III procentuālais saturs kallusa līnijām Nr.1, Nr.2, Nr.3 un Nr.5 pēc divu nedēļu kultivēšanas proliferācijas barotnē (6. att.). Ar dažādiem burtiem apzīmēti varianti, starp kuriem pastāv būtiskas atšķirības ($p < 0.05$). Iegūto rezultātu standartnovirzes (6. att.) liecina par to, ka šis rādītājs stipri variējis arī katra kallusa ietvaros. PEM III procentuālais

saturs būtiski atšķirās kallusa līnijām Nr.4 un Nr.5 (7. att.) pēc trīs nedēļu kultivēšanas proliferācijas barotnē. Standartnovirzes, tāpat kā iepriekšējā gadījumā, norāda uz šī rādītāja variēšanu abu līniju ietvaros. Pēc divu, trīs un četru nedēļu kultivēšanas līnijai Nr.5 PEM III procentuālā satura izmaiņas bija statistiski nebūtiskas. Tomēr tika novērota tendence šim rādītājam pieaugt, līdz ar to procentuāli vislielākais PEM III saturs kallusā bija pēc četru nedēļu kultivēšanas proliferācijas barotnē, bet



8. attēls. PEM III procentuālā satura un somatisko embriju nobriešanas efektivitātes (nobriedušo somatisko embriju skaits uz vienu gramu sākotnējā kallusa) korelāciju reprezentējošs grafiks. Tajā iekļautas visas kallusa līnijas un eksperimentālie varianti. Apzīmējumi: SE – somatiskie embriji; PEM III % – trešajā attīstības etapā esošo proembriogēno masu procentuālais saturs kallusā.

Fig. 8. Correlation between PEM III percentage and efficiency of somatic embryo maturation (obtained number of somatic embryos per gram of initial callus). All calli lines and experimental variants included. Abbreviations: SE – somatic embryos; PEM III % – percentage of proembryogenic mass of third developmental stage in callus.

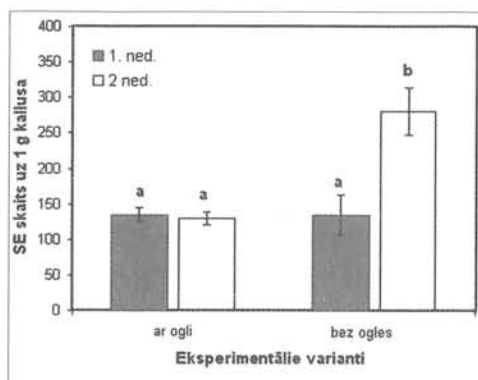


9. attēls. PEM III procentuālā satura un somatisko embriju nobriešanas efektivitātes (nobriedušo somatisko embriju skaits uz sākotnējā kallusa vienu gramu) korelāciju reprezentējošs grafiks. Tajā iekļautastikaikallusa līnijas Nr.4 un Nr.5, kā arī eksperimentālie varianti, kuros proliferācijas apturēšanas barotne nesaturēja aktivēto ogli. Apzīmējumi: SE – somatiskie embriji; PEM III % – trešajā attīstības etapā esošo proembriogēno masu procentuālais saturs kallusā.

Fig. 9. Correlation between PEM III percentage and efficiency of somatic embryo maturation (obtained number of somatic embryos per gramm of initial callus). Included only calli lines Nr.4 and Nr.5 and experimental variants, which no activated charcoal. Abbreviations: SE – somatic embryos; PEM III % - percentage of proembryogenic mass of third developmental stage in callus.

vismazākais – pēc divu.

Datu analīze ļāva secināt, ka visām kallusa līnijām (kurās tika iegūti nobrieduši somatiskie embriji) un visos eksperimentālajos variantos pastāv būtiska korelācija starp PEM III procentuālo saturu un somatisko embriju nobriešanas efektivitāti – ar koeficientu + 0.5112 (8. att.). Tā kā ogles saturam proliferācijas apturēšanas barotnē bija būtiska



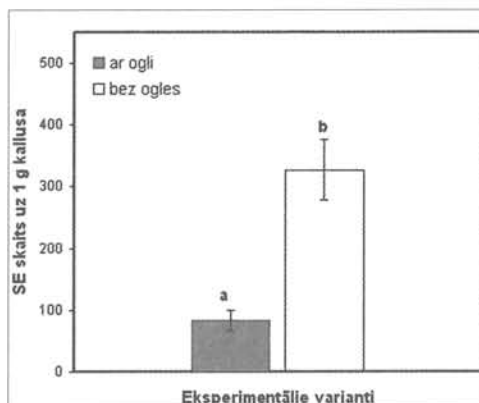
10. attēls. Proliferācijas apturēšanas barotnes sastāva (ar aktivēto ogli vai bez tās) un kultivēšanas ilguma, kā arī abu faktoru mijiedarbības ietekme uz somatisko embriju nobriešanas efektivitāti (nobriedušo somatisko embriju skaits uz sākotnējā kallusa vienu gramu) līnijai Nr.4. Ar dažādiem burtiem apzīmēti varianti, starp kuriem pastāv būtiskas atšķirības ($p < 0.05$). Apzīmējums: SE – somatiskais embrijs.

Fig. 10. Cultivation period and composition (with activated charcoal or no) of medium without plant growth regulators and both factors interaction affected efficiency of somatic embryo maturation (obtained number of somatic embryos per gramm of initial callus) of line Nr.4. Letters indicate variants with significant differences ($p < 0.05$). Abbreviation: SE – somatic embryo.

ietekme (tas tiks aplūkots nākamajā nodaļā), papildus tika noteikta analogiska korelācija tikai kallusa līnijām Nr.4 un Nr.5 eksperimentālajos variantos, kuros proliferācijas apturēšanas barotne nesaturēja aktivēto ogli. Rezultātā korelācijas koeficients pieauga: + 0.6219 (9. att.).

11. attēls. Proliferācijas apturēšanas barotnes sastāva (ar aktivēto ogli vai bez tās) ietekme uz somatisko embriju nobriešanas efektivitāti (nobriedušo somatisko embriju skaits uz sākotnējā kallusa vienu gramu) linijai Nr.5. Ar dažādiem burtiem apzīmēti varianti, starp kuriem pastāv būtiskas atšķirības ($p < 0.05$). Apzīmējums: SE – somatiskais embrijs.

Fig. 11. Composition (with activated charcoal or no) of medium without plant growth regulators affected efficiency of somatic embryo maturation (obtained number of somatic embryos per gramm of initial callus) of line Nr.5. Letters indicate variants with significant differences ($p < 0.05$). Abbreviation: SE – somatic embryo.



Proliferācijas apturēšanas barotnes sastāva un kultivēšanas ilguma ietekme uz somatisko embriju nobriešanas efektivitāti

Kallusa linijai Nr.4 statistisko aprēķinu rezultātā konstatēts, ka proliferācijas apturēšanas barotnes sastāvs (ar aktivēto ogli vai bez tās) būtiski ietekmējis somatisko embriju nobriešanas efektivitāti (10. att.). Tas pats attiecināms uz kultivēšanas ilgumu – vienu vai divas nedēļas. Visaugstākā somatisko embriju nobriešanas efektivitāte konstatēta variantā, kurā kallusi kultivēti divas nedēļas proliferācijas apturēšanas barotnē, kas nesaturēja aktivēto ogli. Statistiski nebija novērtējama somatisko embriju morfoloģija, taču novērojumu rezultātā secināts, ka abi iepriekšminētie kultivēšanas faktori ietekmējuši arī šo rādītāju. Kā jau minēts, minimālais ietekmes efekts tika novērots pēc vienas nedēļas kultivēšanas proliferācijas apturēšanas barotnē, kas nesaturēja ogli. Kallusa linijai Nr.5 statistisko aprēķinu rezultātā konstatēts, ka no proliferācijas apturēšanas kultivēšanas apstākļiem būtiska ietekme bijusi tikai barotnes sastāvam (11. att.). Variantā bez ogles, pēc

vienas nedēļas kultivēšanas proliferācijas apturēšanas barotnē, iegūto somatisko embriju vidējais aritmētiskais ir ievērojami lielāks nekā pēc divu nedēļu kultivēšanas tādos pašos apstākļos. Proliferācijas apturēšanas barotnē ar ogli kultivēšanas laiks somatisko embriju nobriešanas efektivitāti ietekmējis mazāk (11. att.).

DISKUSIJA

Embriogēnās, neembriogēnās kallusa linijas un somatisko embriju nobriešanas efektivitāte

Nobrieduši somatiskie embriji iegūti kallusa līnijām Nr.1, Nr.4 un Nr.5. Lai gan lielākajai daļai no ceturtās, kā arī nelielai daļai no piektās līnijas iegūtajiem somatiskajiem embrijiem novēroti morfoloģiskie defekti, tomēr var secināt, ka minētās kallusa līnijas ir embriogēnas. Šajā pētījumā netika veikta detalizēta mikroskopiskā analīze, tādēļ nav noteikti cēloņi, kāpēc somatiskie embriji nav attīstījušies kallusa līnijām Nr.2 un Nr.3.

Starp dažādām kallusa līnijām konstatētas genotipiskās atšķirības, kas galvenokārt

izpaužas kallusa iniciācijas fāzē, tomēr tās var ietekmēt arī turpmākos kultivācijas etapus, t. sk. somatisko embriju nobriešanas efektivitāti (Park *et al.* 1998). Tādēļ iespējams, ka tas arī ir galvenais cēlonis, kādēļ nobriedušus somatiskos embrijus neizdevās iegūt kallusa līnijām Nr.2 un Nr.3, jo genotipiskās atšķirības īpaši izpaužas pie vājas fitohormonu stimulācijas, un turpmākajos pētījumos (ar Latvijas izcelsmes materiālu) tika secināta auksīna (2,4-D) aktivitātes samazināšanās uzglabāšanas rezultātā. Tāpat jāatzīmē, ka līnijai Nr.2

mikroskopēšanas rezultātā noteikts procentuāli viszemākais PEM III saturs kallusā. Šis rādītājs būtiski ietekmē somatisko embriju nobriešanas iznākumu (Stasolla *et al.* 2001). Pretēji tam līnijai Nr.3, PEM III procentuālais saturs starp visām līnijām pēc divu nedēļu kultivēšanas proliferācijas barotnē bijis vislielākais.

Iespējams, ka somatisko embriju nobriešanas efektivitāti nelabvēlīgi ietekmējusi arī embriogēnā potenciāla samazināšanās ilglaicīgās kultivēšanas dēļ proliferācijas



12. attēls. Morfoloģiski normāli somatiskie embriji (pa kreisi) un ar defektiem (pa labi): uzbrieduši hipokotili, anomāla izmēra dīgļlapas un paši embriji, dažviet daļēja nekroze. Pēc četrus nedēļus kultivēšanas nobriešanas barotnē.



Fig. 12. Somatic embryos with normal morphology (left) and with morphological abnormalities (right): vitrified hypocotyls, abnormal cotyledons and shape of embryos, in some places partial necrosis. After four weeks cultivation on maturation medium.

barotnē, jo, līdz aprakstīto pētījumu veikšanai, visas līnijas (kopš iniciācijas) tika kultivētas aptuveni septiņus mēnešus. Pēc von Arnold (2002) atzinuma, somatisko embriju iegūšanai vēlams izmantot kallusa līnijas, kas proliferācijas barotnē nav kultivētas ilgāk par sešiem mēnešiem.

Līnijas Nr.4 somatiskie embriji attīstījušies visos variantos, bet morfoloģiski normāli – tikai variantā, kur tie proliferācijas apturēšanas barotnē bez ogles kultivēti vienu

nedēļu (12. att.). Pārējos gadījumos vairumam embriju konstatēti morfoloģiski defekti: piebrieduši (vitrificēti) hipokotili, anomāla izmēra dīgļlapas un paši embriji, kā arī daļēja nekroze. Salīdzinot mūsu pētījumos iegūtos somatisko embriju nobriešanas efektivitātes rādītājus ar citu autoru datiem, izriet, ka labākajos eksperimentālajos variantos (kallusa līnijas Nr.1 un Nr.5 proliferācijas apturēšanas barotnē vienu nedēļu, bez ogles) atsevišķiem kallusiem somatisko embriju nobriešanas

efektivitātē bijusi tuva vai līdzīga Becwar *et al.* (1989) rezultātiem, kur uz vienu kallusa gramu vidēji iegūti 700 nobrieduši somatiskie embriji. Lielākā daļa pētnieku kultivēšanai izmantojuši šķidro barotni, kurai raksturīgi ievērojami augstāki somatisko embriju nobriešanas efektivitātes rādītāji. Līdz ar to šādu datu salīdzināšana ar šī pētījuma rezultātiem nebūtu korekta.

Kā viens no veiktā pētījuma trūkumiem atzīmējams salīdzinoši mazais atkārtojumu skaits, jo, piemēram, Gupta un Durzan (1986) katrā pētījuma eksperimentālajā variantā izmantojuši piecus kallusus un trīs atkārtojumus (mūsu darbā katrā variantā izmantoti seši kallusi).

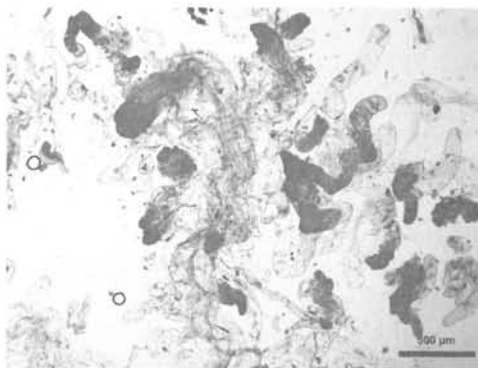
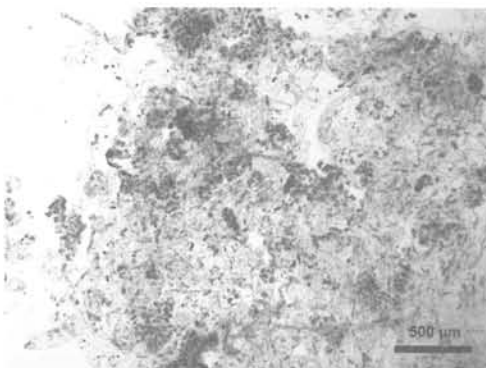
Mikroskopijas metodika un kallusa anatomiskā pārbaude

Lielā kallusu skaita un daudzo eksperimentālo variantu dēļ, kā arī balstoties uz priekšizmēģinājumiem, tika izvēlēta salīdzinoši vienkārša iekrāsošanas metodika, ņemot no katra kallusa sešus preparātus.

Vēlāk secināts, ka PEM III procentuālā satura rezultātu standartnovirzes visām

kallusa līnijām pēc divu, triju un četru nedēļu proliferācijas ievērojami atšķiras. Tas norāda uz to, ka dažādu PEM šūnu agregātu saturs kallusā ir diezgan variabls, ko ietekmē daudzi faktori, bet galvenais ir – preparāta ņemšanas vieta. Līdz ar to, PEM noteikšanas metodes turpmākai optimizācijai būtu vēlams palielināt paņemamo preparātu skaitu, kā arī uzlabot iekrāsošanas tehniku vai arī paralēli lietot vairākus iekrāsošanas veidus. Vēl viens šīs metodes kritiskais punkts ir tas, ka dažkārt precīzi nav saskatāms konkrētais PEM šūnu agregāts, jo preparātā tie var pārklāties vai arī šūnu agregāts var atrasties attīstības robežpunktā. Tomēr, neskatoties uz PEM III procentuālā satura variēšanu kallusa līnijas ietvaros, metodikas efektivitāti apliecina rezultāti – šajā gadījumā būtiska, pozitīva korelācija starp mikroskopiski noteikto PEM III procentuālo saturu un somatisko embriju nobriešanas efektivitāti.

PEM III procentuālā satura variēšanas vienas kallusa līnijas ietvaros (4. tabula) galvenais iemesls ir šūnu agregātu vecuma atšķirības starp kallusa ārējām daļām un vidū, kā arī atšķirības nodrošinājumā ar barības



Dažādi PEM agregāti, preparāts ņemts no kallusa sāniem (kallusa līnija Nr.1)

Grūti noteikt PEM agregātus, preparāts ņemts no kallusa vidus (kallusa līnija Nr.2)

13. attēls. Mikroskopiskā aina kallusa sānos (pa kreisi) un vidū (pa labi) paņemtajos preparātos.
Fig. 13. Microscopic view of specimens of edge of callus (left) and middle of callus (right).

vielām (barotnē). Bieži kallusa vidū ņemtajos preparātos PEM agregāti ir grūti identificējami, jo atšķiras šūnu iekrāsojums (13. att.). Tas izskaidrojams ar to, ka šūnām vecuma un resursu (galvenokārt skābekļa) trūkumu dēļ kallusa vidū ir pazemināta vielmaiņa, t. sk. mitoze, kā rezultātā PEM agregāta galvas daļas šūnas satur mazāk nukleīnskābju un līdz ar to iekrāsošanās intensitāte ir vājāka un šīs šūnas grūtāk atšķiramas no suspensoru vai citām šūnām. Tāpat resursu trūkums izraisa arī šūnu agregātu dezintegrēšanos un nekrozi.

Pēc *Szczygieł* ieteikuma (nepublicēti dati) – turpmākai kallusa kultivēšanai no mātes kallusa paņemamas tikai ārējās daļas (augšējās un sānu), kas tika ievērots arī šajā darbā, iegūstot kallusus eksperimentālajiem variantiem bez mātes kallusa vidējās daļas, bet PEM III aprēķināšanai preparātus ņemot no kallusa sāniem un augšas.

PEM III procentuālais saturs kallusā, tā korelācija ar somatisko embriju nobriešanas efektivitāti

Tādēļ, ka linijām Nr.2 un Nr.3 somatiskie embriji neattīstījās vispār, bet linijai Nr.5 tie neattīstījās tādā pašā eksperimentālajā variantā, nebija iespējams novērtēt, cik lielā mērā PEM III procentuālais saturs ietekmē somatisko embriju nobriešanas efektivitāti starp dažādām kallusa linijām vienādos kultivēšanas apstākļos. Tas pats attiecināms uz linijām Nr.4 un Nr.5 pēc triju nedēļu kultivēšanas proliferācijas barotnē, jo kultivēšanas apstākļu (ogles saturs barotnē) ietekme abām linijām bija atšķirīga.

PEM I līdz PEM III optimālos apstākļos attīstās 10 – 15 dienu laikā (*Filonova et al.* 2002a). No tā izriet, ka proliferācijas barotnē PEM III procentuālais saturs kallusā maksimumu sasniedz aptuveni divu-trīs nedēļu kultivēšanas laikā. Iespējams, ka konkrētajā pētījumā nebija nodrošināti tik optimāli

kultivēšanas apstākļi kā *Filonova et al.* (2002a) pētījumā, tādēļ PEM III procentuālais saturs maksimumu sasniedza pēc trīs līdz četru nedēļu proliferācijas. Novērojumi liecina, ka vairāk nekā četru nedēļu kultivēšana proliferācijas barotnē izraisa kallusa morfoloģiskās un anatomiskās izmaiņas: kallusa krāsa kļūst tumšāka (no dzeltenas līdz brūnai), samazinās suspensoru šūnu skaits un izmainās galvas daļas šūnu morfoloģija.

PEM III procentuālā satura un somatisko embriju nobriešanas efektivitātes pozitīvā korelācija ir svarīgs rādītājs, kas būtu izmantojams turpmākajos pētījumos – parastās egles somatiskās embriogēzes metodes optimizēšanai. Proliferācijas barotnes sastāva, kultivēšanas ilguma un citu apstākļu izmaiņas ietekmē PEM III procentuālo saturu kallusā. Balstoties uz mikroskopijas datiem, varēs secināt, kādi apstākļi veicina PEM III procentuālo pieaugumu, līdz ar to palielinot varbūtību, ka nobriedušu somatisko embriju veidosies vairāk (*Filonova et al.* 2000a).

Atkārtojumu skaits nebija pietiekams, lai aprēķinātu korelāciju starp PEM III procentuālo saturu un somatisko embriju nobriešanas efektivitāti katra kallusa ietvaros. Šādi dati būtu lietderīgi konkrēto kallusa liniju (genotipa) ietekmes novērtēšanai. Jāatzīmē, ka iegūtie korelāciju koeficienti ir mazāki nekā prognozēti. To varētu skaidrot gan ar mikroskopijas metodikas neprecizitāti, gan ar dažādu kultivēšanas faktoru negatīvo ietekmi proliferācijas un / vai somatisko embriju nobriešanas laikā.

Turpmākajos pētījumos būtu vēlams intensīvāka vairāku mikroskopijas metožu izmantošana iespējami precīzākai dažādu kultivēšanas apstākļu novērtēšanai šūnu limenī kallusa attīstības gaitā – pārejot no proliferācijas uz somatisko embriju nobriešanas procesiem. Tas ļautu, no praktiskā viedokļa, optimizēt

kultivēšanas metodiku. Jāatzīmē, ka līdz šim veiktie pētījumi par šūnu agregātu attīstību un to programmēto nāvi somatisko embriju nobriešanas procesā (Konget al. 1999; Filonova et al. 2000a; Filonova et al. 2000b) galvenokārt ir teorētiska rakstura.

Proliferācijas apturēšanas barotnes

sastāva un kultivēšanas ilguma ietekme uz somatisko embriju nobriešanas efektivitāti

Pētījumu rezultāti liecina, ka kallusa līnijām Nr.4 un Nr.5 PEM III attīstības pāreju no proliferācijas uz tālāko somatisko embriju nobriešanu būtiski ietekmē barotnes sastāvā ietilpstošā aktivētā ogle. Konkrētajā darbā izmantotais somatiskās embriogēneses kultivēšanas protokols, ar nelielām izmaiņām, aizgūts no Szczygieł (2005), tomēr iegūtie rezultāti nesakrīt ar iepriekšminētās autoreces secinājumiem, ka vienas nedēļas kultivēšana proliferācijas apturēšanas barotnē ar ogli ir visoptimālākais variants somatisko embriju nobriešanas veicināšanai; līdzīgu atzinumu izteicis arī Becwar et al. (1987).

Barotnei pievienotā aktivētā ogle absorbē fitohormonus un dažādus vielmaiņas produktus, t. sk. augam toksiskas vielas, piemēram, fenolu savienojumus. Svarīgākais aktivētās ogles pievienošanas iemesls somatisko embriju kultūrās ir augsīna 2,4-D eliminēšana, jo tā fizioloģiskā ietekme inhibē turpmāko somatisko

embriju nobriešanas gaitu (von Arnold et al. 2002). Visi aktivētās ogles iedarbības veidi augu audu kultūrās vēl nav pilnīgi izpētīti, un dažkārt secināts, ka tie nelabvēlīgi ietekmē organoģenēzi un embriogēzi (Pan & Staden 1998). Šajos pētījumos novērotajai ogles inhibējošajai iedarbībai uz somatisko embriju nobriešanas efektivitāti izskaidrojums gan nav viennozīmīgs. Par vispieņemamāko autors uzskata variantu, kur augsīna 2,4-D aktivitāte ir samazinājusies ilglaicīgas uzglabāšanas rezultātā. Līdz ar to kallusa attīstības pārejas posmā uz somatisko embriju nobriešanu nav nepieciešamības novērst šī augsīna iedarbību, un tāpēc ogle neveic savu galveno funkciju, bet tikai absorbē organiskos savienojumus un sāļus. Tieši šī iemesla dēļ, salīdzinot ar bezogles variantiem, somatisko embriju nobriešanas efektivitāte bija zemāka.

Apkopojot iegūtos rezultātus, var pieņemt, ka visaugstākā somatisko embriju nobriešanas efektivitāte un kvalitātes rādītāji būtu sasniedzami tad, ja kallusa līnijas Nr.4 un Nr.5 kultivētu proliferācijas barotnē trīs vai četras nedēļas, bet ogli nesaturošā proliferācijas pārtraukšanas barotnē – vienu nedēļu. Līdzīgs pieņēmums nav attiecināms uz pārējām līnijām, jo nav datu par proliferācijas apturēšanas barotnes sastāva un kultivēšanas ilguma ietekmi.

Secinājumi

1. Kallusa līnijām Nr.1, Nr.4 un Nr.5 kultivēšanas rezultātā attīstījās somatiskie embriji, tātad minētās kallusa līnijas ir embriogēnas.
2. Kallusa līnijām Nr.2 un Nr.3 somatiskie embriji netika iegūti, iespējams, ka genotipisko atšķirību dēļ, kuras vēl pastiprināja vājā auksīna 2,4-D fizioloģiskā iedarbība. Zemais PEM III procentuālais saturs kallusā norāda uz to, ka līnija Nr.2 iespējams bija neembriogēna.
3. Izmantotā mikroskopijas metodika proembriogēno masu procentuālā satura noteikšanai bija pietiekami efektīva, tomēr turpmākajos pētījumos to vēlams uzlabot, lai mazinātu PEM III procentuālā satura rezultātu standartnovirzes viena kallusa ietvaros.
4. Pētījumu rezultāti apstiprināja iepriekš izvirzīto hipotēzi, ka pastāv būtiska pozitīva korelācija starp trešajā attīstības etapā esošo proembriogēno masu un somatisko embriju nobriešanas efektivitāti.
5. Pāreja proembriogēno masu attīstībā no proliferācijas uz somatisko embriju nobriešanas stadiju ir viens no svarīgākajiem kritiskajiem punktiem parastās egles somatiskajā embriogēnēzē. To apstiprina kallusa līnijām Nr.4 un Nr.5 iegūtie rezultāti, kas liecina par proliferācijas pārtraukšanas barotnes sastāva un kultivēšanas ilguma būtisko ietekmi uz somatisko embriju nobriešanas efektivitāti.

Literatūra

- Becwar M. R., Noland T. L. and Wann S. R.** 1987. A method for quantification of the level of somatic embryogenesis among Norway spruce callus lines. *Plant Cell Rep.*, 6: 35-38.
- Becwar M. R., Noland T. L. and Wyckoff J. L.** 1989. Maturation, germination, and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 25: 578-580.
- Bellarosa R., Mo L. H. and von Arnold S.** 1992. The Influence of Auxin and Cytokinin on Proliferation and Morphology of Somatic Embryos of *Picea abies* (L.) Krast. *Annals Bot.*, 70: 199-206.
- Bozhkov P. V., Filonova L. H. and von Arnold S.** 2002. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotech. Bioengin.*, 77(6): 658-667.
- Filonova L. H., Bozhkov P. V. and von Arnold S.** 2000a. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-laps tracking. *J. Exp. Bot.*, 51(343): 249-264.
- Filonova L. H., Bozhkov P. V., Brukhin V. B., Daniel G., Zhivotovsky B. and von Arnold S.** 2000b. Developmental programmed cell death in plant embryogenesis: exploring a model system of Norway spruce somatic embryogenesis. *J. Cell Science*, 113(24): 4399-4411.
- Fiļipovičs M., Szczygieł K., Auzenbaha D. un Gailis A.** 2006. Embriogēno audu iniciācija

- parastajai eglei. *Mežzinātne* 15 (48): 60-67.
- Gupta P. K. and Durzan D. J.** 1986. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 22: 685-688.
- Kong L., Attree S. M., Evans D. E., Binarova P., Yeung E. C. and Fowke L. C.** 1999. Somatic embryogenesis in white spruce: studies of embryo development and cell biology. In: Jain S. M., Gupta P. K. and Newton R. J. (eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Vol. 4 (pp. 1–28). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Pan M. J. and van Staden J.** 1998. The use of charcoal in in vitro culture – A review. *Plant Growth Reg.* 26: 155-163.
- Park Y. S., Barrett J. D., Bonga J. M.** 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* 34: 231-239.
- Roberts D. R., Lazaroff W. R. and Webster F. B.** 1991. Interaction between Maturation and High Relative Humidity Treatments and their Effects on Germination of Sitka Spruce Somatic Embryos. *J. Plant Physiol.*, 138: 1-6.
- Szczygieł K.** 2005. Somatyczna embriogeneza – alternatywny sposób uzyskania wyselekcjonowanego materiału sadzeniowego gatunków drzew iglzystych. *Leśne Prace Badawcze*. 3: 71-92.
- Stasolla C., Loukanina N., Ashihara H., Yeung E. C. and Thorpe T. A.** 2001. Ascorbic acid changes the pattern of purine metabolism during germination of white spruce somatic embryos. *Tree Physiol.*, 21: 359–367.
- Von Arnolds S., Clapham D., Egertsdotter U. and Mo L. H.** 1996. Somatic embryogenesis in conifer – A case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*. *Plant Growth Regul.*, 20: 3-9.
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. and Filonova L.** 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 69: 233-249.
- Von Arnold S., Bozhkov P., Clapham D., Dyachok J., Filonova L., Högborg K., Ingouff M. and Wiweger M.** 2005. Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 81: 323-329.
- Паушева З. П.** 1980. Практикум по цитологии растений 3-е изд. Москва „Колос”.