

ALEKSANDRO STULGINSKIO UNIVERSITETAS

AGRONOMIJOS FAKULTETAS

Biologijos ir augalų apsaugos institutas

Ineta Armonaitė

AUGIMO REGULIATORIŲ POVEIKIS *MISCANTHUS X GIGANTEUS*

MORFOGENEZEI *IN VITRO*

Magistro baigiamasis darbas

Studijų sritis: Technologijų mokslai

Studijų kryptis: Biotechnologija

Studijų programa: Agrobiotechnologija

Akademija, 2015

Magistro baigiamojo darbo valstybinė kvalifikacinė komisija:

(Patvirtinta Rektorius įsakymu Nr. 131-PA)

Agronomijos fakulteto studentų baigiamųjų darbų vertinimo komisijos įvertinimas:

.....

Pirmininkas: Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės instituto Sodo augalų genetikos ir biotechnologijos skyriaus vedėjas profesorius habil. dr. Vidmantas Stanys (mokslininkas-praktikas)

Nariai:

Lietuvos Sodininkystės ir daržininkystės instituto Augalų fiziologijos laboratorijos vedėjas profesorius habil. Dr. Pavelas Duchovskis (mokslininkas-praktikas)

Agronomijos fakulteto prodekanas, Biologijos ir augalų biotechnologijos instituto docentas dr. Aurimas Krasauskas (mokslininkas)

Biologijos ir augalų biotechnologijos instituto direktorė, profesorė dr. Natalija Burbulis (mokslininkas)

Agronomijos fakulteto prodekanė Biologijos ir augalų biotechnologijos instituto docentė dr. Liuda Žilėnaitė (mokslininkas)

UAB „Euromediena“ direktorius Mindaugas Šilininkas (socialinis partneris-praktikas)

Vadovė Biologijos ir augalų biotechnologijos instituto docentė dr. Aušra Blinstrubienė

Recenzentė Biologijos ir augalų biotechnologijos instituto profesorė dr. Natalija Burbulis

Oponentė Žemės ūkio ir maisto mokslo instituto profesorė dr. Honorata Danilčenko

Armonaitė, I. Augimo reguliatorių poveikis *Miscanthus x giganteus* morfogenezei in vitro. Agrobiotechnologijos studijų programos magistro darbas / Vadovė doc. dr. A. Blinstrubienė; ASU. Akademija, 2015, 40 p.: 11 pav., 1 lentelė. Bibliogr.: 67 pavad.

SANTRAUKA

Magistratūros studijų baigiamajame darbe pateikiama 2013 – 2014 metais Aleksandro Stulginskio universiteto Agrobiotechnologijos laboratorijoje tirtų veiksmų, lemiančių drambliažolės morfogenezę izoliuotų audinių ir ląstelių kultūroje, tyrimo rezultatai.

Darbo objektas – drambliažolė (*Miscanthus x giganteus*).

Darbo metodai: Drambiliažolės morfogenezei somatinių audinių kultūroje tirti naudoti šaknų ir šakniastiebių segmentai. Eksplantai auginti MS maitinamojoje terpėje su skirtingais augimo reguliatorių kiekiais. Vertintas kaliaus susiformavimo dažnis (proc.), ūglių susiformavimo dažnis (proc.), ūglių kiekis iš eksplanto (vnt.) ir šaknų susiformavimo dažnis (proc.).

Darbo rezultatai. Tirtų augimo reguliatorių poveikyje izoliuoti šakniastiebiai formavo tik pridėtinius ūglius, o šaknų segmentai – tik kalių. Įvertinus drambliažolės morfogenezės tyrimų rezultatus nustatyta, kad drambliažolės izoliuoti šaknų audiniai nedideliu dažniu geba formuoti kalių terpėje be augimo reguliatorių. Izoliuoti šaknų segmentai intensyviausiai kalių indukavo bazinėje MS maitinamojoje terpėje, papildytoje augimo reguliatorių deriniu 0,1 mg l⁻¹ tidiazuronu su 3,0 mg l⁻¹ naftilacto rūgštimi. Daugiausiai ūglių regeneravo taip pat bazinėje MS maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,1 mg l⁻¹ tidiazuronu su 3,0 mg l⁻¹ naftilacto rūgštimi. Izoliuoti mikroūglių segmentai didžiausiu dažniu (94,6 proc.) šaknis formavo MS maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,2 mg l⁻¹ naftilacto rūgštimi.

Raktažodžiai: augimo reguliatoriai, eksplantas, kaliaus indukcija, *Miscanthus x giganteus*, organogenezę, rizogenezę.

Armonaitė, I. Growth regulators effect to *Miscanthus × giganteus* morphogenesis in vitro. Master thesis of Agrobiotechnology study program / Supervisor doc. dr. A. Blinstrubienė; ASU. Akademija, 2015, 40 p.: 11 figures, 1 table. References.: 67 titles.

SUMMARY

The master work presents the results of factors affecting *Miscanthus × giganteus* Greef et Deuter., dedifferentiation process *in vitro*. Research was investigated at the Laboratory of Agrobiotechnology, Biology and plant biotechnology institute of Aleskandras Stulginskis University in 2013 – 2014. Investigation *in vitro* was carried out with *Miscanthus × giganteus* Greef et Deuter., microshoots explants.

Object of the work – *Miscanthus × giganteus* Greef et Deuter.

Method of the work – To study *Miscanthus × giganteus* Greef et Deuter., morphogenesis of somatic tissues of root and rhizomes were used as explant. Explants were placed on MS nutrient medium supplemented with a different combinations of growth regulators. The callus formation frequency (percent.), shoots number of the explant (units) and the frequency of root formation (percent.) were evaluated.

The results of the work – According to the study results isolated rhizome had formed just bud, rhizome segments had formed – callus. *Miscanthus × giganteus* Greef et Deuter morphogenesis tissues with low frequency can form callus and without growth regulators in the medium. From tested media most intensive callus genesis was observed on MS medium with in growth regulator combination with 0,1 mg l⁻¹ thidiazuron and 3,0 mg l⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid. The most effective dedifferentiation induction of shoots also with in growth regulator combination with 0,1 mg l⁻¹ thidiazuron and 3,0 mg l⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid. Microshoots showed the highest root regeneration frequency (94,6 percent.) when explants were growth in medium supplemented with 0,2 mg l⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid.

Key words: growth regulators, explant, callus induction, organogenesis, rhyzogenesis, *Miscanthus × giganteus*.

TURINYS

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	6
TERMINŲ IR SĄVOKŲ PAAIŠKINIMAI BEI SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS ANALIZĖ	10
1.1. Drambliažolės paplitimas ir reikšmė	10
1.2. Morfologinės ir biologinės savybės.....	11
1.3. Morfogenezė.....	13
1.4. Morfogenezę lemiantys veiksniai.....	14
2. TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS	18
2.1. Augimo reguliatorių parinkimas <i>Miscanthus</i> × <i>giganteus</i> kaliaus indukcijai ir organogenezėi.....	18
2.2. Aukšinių parinkimas <i>Miscanthus</i> × <i>giganteus</i> mikroūglių rizogenezėi.....	19
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ.....	22
3.1. Drambliažolės kaliaus indukcija.....	22
3.2. Drambliažolės organogenezė.....	24
3.3. Drambliažolės rizogenezė	28
IŠVADOS.....	31
LITERATŪRA.....	32
DARBO APROBACIJA IR PUBLIKACIJA.....	39
PRIEDAI	40

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1. 3.1.1. pav. *Miscanthus x giganteus* kaliaus genezė *in vitro* (22 psl.).
2. 3.1.2 pav. Augimo reguliatorių BAP ir NAR poveikis drambliažolės kaliaus indukcijai izoliuotų šaknų kultūroje (23 psl.).
3. 3.1.3 pav. Augimo reguliatorių TDZ ir NAR poveikis drambliažolės kaliaus indukcijai izoliuotų šaknų kultūroje (23 psl.).
4. 3.2.1 pav. Augimo reguliatorių BAP ir NAR poveikis drambliažolės ūglių formavimosi dažniui izoliuotų šakniastiebių kultūroje (24 psl.).
5. 3.2.2 pav. Augimo reguliatorių BAP ir NAR poveikis drambliažolės ūglių išeigai izoliuotų šakniastiebių kultūroje (25 psl.).
6. 3.2.3 pav. Augimo reguliatorių TDZ ir NAR poveikis drambliažolės ūglių formavimosi dažniui izoliuotų šakniastiebių kultūroje (26 psl.).
7. 3.2.4 pav. Augimo reguliatorių TDZ ir NAR poveikis drambliažolės ūglių išeigai izoliuotų šakniastiebių kultūroje (27 psl.).
8. 3.2.5 pav. *Miscanthus x giganteus* organogenezė *in vitro* (27 psl.).
9. 3.3.1 pav. Aukso NAR poveikis drambliažolės mikroūglių įsišaknijimo dažniui (28 psl.).
10. 3.3.2 pav. Aukso IAR poveikis drambliažolės mikroūglių įsišaknijimo dažniui (29 psl.).
11. 3.2.5 pav. *Miscanthus x giganteus* rizogenezė *in vitro* (A – rizogenezė su auksinu NAR; B – rizogenezė su auksinu IAR) (30 psl.).

TERMINŲ IR SĄVOKŲ PAAIŠKINIMAI BEI SANTRUMPOS

Augimo reguliatoriai – tiek sintetinės fiziologiškai aktyvios medžiagos, tiek natūraliai randami fitohormonai, veikiantys augalų raidą.

BAP – 6-benzilaminopurinas.

Diferenciacija – kokybinių skirtumų atsiradimas tarp ląstelių, audinių ir organų.

Eksplantas – augalo audinio ar organo izoliuota dalis.

Genotipas – organizmo genetinių galimybių visuma.

HMF – 5-(hidroksimetilinas) –2furaldehidas.

IAR – 3-indolilacto rūgštis

In vitro – procesai ar eksperimentai, atliekami mėgintuvėlyje.

Kalius – antrinė meristemos masė, natūraliomis sąlygomis aptraukianti pažeistas augalų vietas ir padedanti joms užgyti, taip pat susidaranti dirbtinai auginant izoliuotas augalo ląsteles ar audinius *in vitro*.

Morfogenezė- organizmo raidos genetinės programos realizavimas

MS – Murashige ir Skoog maitinamoji terpė.

NAR- α – naftilacto rūgštis.

natūraliai randami fitohormonai, veikiantys augalų raidą.

Organogenezė – organų susidarymas.

Rizogenezė – šaknų susidarymo procesas.

Sterilios sąlygos – augalų audinių kultūroje pasiekiamos autoklavuojant instrumentus, kultūrų indus, terpę bei operacinėse dezinfekuojant įrenginių paviršius, juos nuvalant alkoholiu ar kitu dezinfekuojančiu tirpalu.

TDZ – tidiazuronas.

IVADAS

Miscanthus x giganteus yra sterilus triploidas (diploido *M. sinensis* ir tetraploido *M. sacchariflorus* hibridas), natūraliai atželiantis nuo poskiepių, todėl dauginasi išskirtinai vegetatyviniu būdu. Drambliažolė yra daugiametis šakniastiebinis žolinis augalas, kuriam būdinga C₄ fotosintezės eiga, kilęs iš Azijos tropinių ir subtropinių regionų (Greef, Deuter, 1993; Linde-Laursen, 1993). Pasižymi puikia galimybe konvertuoti Saulės energiją į biomasės energiją (Lewandowski, Schmidt, 2006), taip pat – maža CO₂ emisija ir puikiu atsparumu sausrui ir druskoms (Clifton-Brown et al., 2004; Hastings et al., 2008). Dėl didelės biomasės ir aukštos kokybės celiuliozės derliaus *Miscanthus* galima priskirti prie labai naudingų nemaistinių augalų (celiuliozės bei įvairių pakuočių gamyboje, stogų dengimui, užterštų laukų atkūrimui, valgomųjų grybų auginimui) (Fowler et al., 2003), o Europoje daugiausia dėmesio skiriama *Miscanthus* genčiai, kaip potencialios energijos šaltiniui.

Drambliažolė yra šilumamėgis augalas, nes produktyvi reprodukcija galima esant aukštesnei kaip 20 °C temperatūrai (Naidu, Long, 2004; Lewandowski, 2006). Šilumos poreikis labai padidina produkcijos kainą, tačiau didelės išlaidos sodinamosios medžiagos padauginimui ir būtinas nemažas augalų kiekis ploto vienetai apriboja platesnį *Miscanthus x giganteus* auginimą ir panaudojimą (Atkinson, 2009).

Mikrodauginimas sudaro sąlygas greitai padauginti svarbią medžiagą ne tik selekcinėms programoms. Dauginant augalus *in vitro* išvengiama sezoniškumo, apikalinių meristemų panaudojimas leidžia devirusuoti pradinę medžiagą, padaugintą medžiagą lengva gabenti ir vykdyti tarptautinius mainus (Govil, Gupta, 1997). Izoliuotų *Miscanthus x giganteus* audinių, organų ir ląstelių kultūros tyrimų ypatumai skelbti keliose mokslinėse publikacijose (Holme, Petersen, 1996; Holme, 1998; Petersen et al., 1999; Kim et al., 2010), jose teigiama, kad morfogeninio kaliaus indukcija, ūglių regeneracija ir jų įšaknydinimas priklauso nuo maitinamosios terpės sudėties, eksplanto tipo ir jo fiziologinės būklės. Siekiant pritaikyti izoliuotų audinių ir ląstelių kultūros metodus masiniam drambliažolės dauginimui būtina optimizuoti šio augalo regeneraciją *in vitro*.

Hipotezė: optimizavus maitinamosios terpės sudėtį galima indukuoti drambliažolės morfogenezę iš įvairių somatinių eksplantų.

Tyrimo tikslas – įvertinti augimo reguliatorių poveikį *Miscanthus x giganteus* morfogenezei somatinių audinių kultūroje

Uždaviniai:

- įvertinti augimo reguliatorių poveikį kaliaus indukcijai drambliažolės somatinių audinių kultūroje;
- nustatyti augimo reguliatorių poveikį ūglių regeneracijai drambliažolės somatinių audinių kultūroje;
- įvertinti auksinų poveikį mikroūglių įsišaknijimui *in vitro*.

1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. Drambliažolės paplitimas ir reikšmė

Daugiamečiai *Miscanthus* rūšies augalai yra milžiniškos žolės, atkeliavusios iš Rytų Azijos (Glowacka et al., 2010 a), prieš 50 metų, kaip dekoratyvinis augalas (Angelini et al., 2009). Auga daugiau kaip 20 rūšių Azijos subtropikų ir atogrąžų zonose (Rambaud et al., 2013). Drambliažolė Europoje introdukuota 1935 metais iš Japonijos (Lewandowski et al., 2000; Glowacka et al., 2010).

Hibridas *Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deuter buvo sukurtas 1993 metais (Zinkevičius ir kt., 2013). *Miscanthus* × *giganteus* (drambliažolė) – tai miglinių (*Poaceae*) šeimos (Zur et al., 2013), *Miscanthus spp.*, genties augalas, fiziologiškai priklausantis trumpadieniams (Zinkevičius ir kt., 2013), daugiametis žolinis augalas, kuris dėl savo didelio biomasės produktyvumo ir mažo poreikio augimo sąlygoms, tapo perspektyvus augalas biokuro/ bioenergijos gamybai (Zur et al., 2013), pluošto produkcijai (Hansen, Kristiansen, 1997), bei gali būti naudojamas statybinėms medžiagoms, tokioms kaip, presuotos plokštės (Lewandowski, 1998). *Miscanthus* biomasė tinka ne tik energijos ir pramonės reikmėms, bet ateityje galėtų tapti pigiu šaltiniu etanolio ir chemijos gamyboje (Glowacka et al., 2010 b). Skirtingu metu *M. × giganteus* buvo vadinama *Miscanthus sinensis* ‘Giganteus’, *Miscanthus giganteus*, *Miscanthus ogiformis* Honda, *Miscanthus sacchariflorus* var *brevibarbis* (Honda) Adati ir *M. × giganteus* (Greef, Deuter, 1993; Ahonsi et al., 2013).

Pastaraisiais metais didėjant naftos paklausai ir mažėjant turimos naftos rezervams, daug dėmesio skiriama bioenergetikai (Moon et al., 2013). Iškastinis kuras toks kaip naftos alyva, anglis ir gamtinės dujos, šiuolaikiniame pasaulyje yra patys svarbiausi energijos šaltiniai, tačiau minėto kuro suvartojimas prisideda prie aplinkos problemų, tokių kaip šiltnamio efekto dujų koncentracijos, klimato kaitos, bei oro užterštumo. Be to, iškastinis kuras yra ribotų išteklių, o nestabilumas tarp pasiūlos ir paklausos, veda prie didesnių naftos kainų (Da et al., 2012). Todėl, *Miscanthus* augalai plačiau auginami kaip perspektyvūs naujos kartos bioenergetikos kultūros, dėl savo didelio biomasės našumo ir maistinių medžiagų (Kryževičienė ir kt.; Moon et al., 2013). *Miscanthus* kaip potencialus augalas celiuliozės pluošto produkcijai Europoje, buvo pradėtas tirti jau nuo 1960 metų (Abe et al., 2011). O atlikti tyrimai įvairiose klimato juostose, dirvožemiuose ir regionuose per pastaruosius 20 metų JAV ir Europoje, įrodė, kad *Miscanthus* yra augalas, duodantis didžiausią biomasės potencialą (Kryževičienė ir kt., 2011).

Yra manoma, kad drambliažolė didelį derlių nulemia, atsparumas ligoms ir kenkėjams. Atsparumas kenkėjams ir ilgaamžiškumas, yra du pagrindiniai bruožai, įtakojantys drambliažolės pritaikymą, biodegalų gamybai. Manoma, kad pradėjus masiškai auginti šį augalą, o ypač drambliažolės klonus, kurie gaunami dauginant šakniastiebius, dėl genetinės įvairovės trūkumo, kyla didžiulė ligų išsivystymo bei kenkėjų antplūdžio rizika ir tai gali nulemti biomasės produktyvumą (Ahonsi et al., 2013).

Augalų santykis tarp rūšių įvairovės ir produktyvumo ar biomasės tirti daugelio mokslininkų (Iwaki et al., 1985). Daugiametės žolės, tokios kaip *Miscantus*, kelia labai didelį susidomėjimą dėl tikslaus panaudojimo bioenergijos. Jos duoda didelį biomasės derlių ir geba augti nederlingose žemėse. Daugiametės žolės turi ir kitų teigiamų savybių aplinkai, tokių kaip dirvožemio apsauga nuo erozijos, bei mažesnė vandens tarša, dėl mažesnio azotinių trąšų poreikio (Da et al., 2012). Danijos mokslininkai nustatė, kad auginant *Miscanthus* nuo 9–16 metų iš eilės toje pačioje vietoje padidėja organinės anglies kiekis padidėja iki 65 proc. 0–20 cm sluoksnyje, – iki 9 proc. 20–50 cm ir – iki 6 proc. 50–100 cm sluoksnyje. *Miscanthus* taip pat geba vykdyti simbiozę su azotą fiksuojančiomis bakterijomis, todėl ne visada reikia tręšti azotinėmis trąšomis siekiant padidinti biomasės kiekį (Kryževičienė ir kt., 2011). Taip pat, daugiametės žolės gali suteikti prieglobstį laukiniams gyvūnams, padidinti paukščių rūšių įvairovę (Da et al., 2012). *Miscanthus* taip pat galima auginti labai įvairiame dirvožemyje. Šie augalai sunaudoja daug vandens, jų šaknys pasižymi aukšta sorbcijos galia, taip pat labai efektyviai sugeria dirvos drėgmę. Drambiliažolės vandens sunaudojimo efektyvumas siekia 0,6–0,8 proc., kai tuo tarpu kitų C_3 augalų vandens sunaudojimo efektyvumas siekia tik 0,19–0,37 proc. (Kryževičienė ir kt., 2011). Optimalus dirvos drėgnumas yra 40 – 50 proc., o tai reiškia, kad *Miscanthus* augalai gali augti net smėlio dirvožemyje. Kadangi *Miscanthus* augalai greitai auga ir puikiai prisitaiko prie įvairios ekologinės aplinkos, juos augina ir tyrinėja Europos šalių mokslininkai, įskaitant iš Daniją, Nyderlandų, Vokietijos, Austrijos, Šveicarijos, Anglijos ir Lenkijos (Lee et al., 2012).

1.2. Morfologinės ir biologinės savybės

Kadangi *M. giganteus* yra natūraliai sterilus hibridas, nesubrandinantis sėklų, dėl to jis dauginamas vegetatyviškai, padalinant šakniastiebius arba mikrodauginimo būdu (Holme, Petersen, 1996; Holme et al., 1997; Angelini et al., 2009; Juvik et al., 2010) kas reikalauja labai daug darbo ir brangių investicijų. Buvo paskaičiuota, kad vieno 1 ha ploto įveisimas dauginant mechaniškai, atskiriant šakniastiebius, kainuotų €350 (Juvik et al., 2010).

Citologiniai ir molekuliniai tyrimai parodė, kad drambliažolė yra natūralus triploidas ($2n = 3x = 57$), kilęs iš diploidinio *Miscanthus sinensis* ($2n = 2x = 38$) ir tetraploidinio *Miscanthus sacchariflorus* ($2n = 4x = 76$) (Lee et al., 2012; Zurs et al., 2013), natūraliai ataugantis iš vegetatyviškų šakniastiebių (Dubert, Plazek, 2010).

Miscanthus turi sudėtinius žiedynus. Sėklos labai mažos ir lengvos, 1000 sėklų svoris svyruoja tarp 263–950 mg (Lee et al., 2012).

Stiebai turtingi ligninu ir lignoceliulioze, siekia nuo 1–3 m aukščio, priklausomai nuo rūšies ir augimo sąlygų (Lee et al., 2012).

Lietuvos žemdirbystės institute, Dotnuvoje, atliktame tyrime su *Miscanthus* × *giganteus* buvo gautas 6–9 t ha⁻¹ sausos biomasės derlius, o esant palankioms meteorologinėms sąlygoms derlius siekė net 12 t ha⁻¹ (Kryževičienė ir kt., 2011).

Zinkevičius ir kt. (2013) teigia, kad drambliažolių pranašumas prieš kitus energetinius augalus neabejotinas šiltesnio klimato juostose, tačiau šiaurės šalyse tyrėjų vertinimai yra įvairūs. Švedijoje, Danijoje, Anglijoje, Vokietijoje ir Portugalijoje tirtų 15 *Miscanthus* genotipų apibendrinti duomenys rodo, kad jų sausos biomasės derlius kiekvienais metais didėja, pirmaisiais metais nuo 2 t ha⁻¹, antraisiais ir trečiaisiais – iki 9–18 t ha⁻¹. Atskirų hibridų biomasė siekė iki 29 t ha⁻¹, Portugalijoje net iki 40,9 t ha⁻¹. Pietų Ilinojuje (JAV), buvo gautas 44 t ha⁻¹ derlius (Lee et al., 2012). Vėsiuose klimatuose augalų sausųjų medžiagų biomasės derlius siekia nuo 20 t ha⁻¹ (Beale et al., 1996), iki 61 t ha⁻¹ derlius (Wang et al., 2011).

Tyrimais nustatyta kad, tie genotipai, subrandinę geresnį derlių vėsesnėse klimato juostose buvo mažiau produktyvūs šiltesnėse klimato juostose (Zinkevičius ir kt. 2013). Kietajam kurui geriausias laikas nuimti derlių yra vasario, kovo mėnesiai, nes tuomet mažai vandens, pelenų ir mineralų, tokių kaip chloridas (Lewandowski, 1998).

Derliaus kiekis priklauso nuo kritulių kiekio ir jų pasiskirstymo. Įrodyta, kad vandens prieinamumas yra svarbus faktorius, nulemiantis derliaus kiekį (Angelini et al., 2009). Europoje ištirtų *Miscanthus* rūšių sausųjų medžiagų biomasės elementai sudarė: pelenai – 1,6–4,0 proc., N – 0,19–0,67 proc., K – 0,31–1,28 proc., Ca – 0,08–0,14 proc., Cl – 0,10–0,50 proc., ir S – 0,04–0,19 proc. (Ka et al., 2012).

M. giganteus sugebėjimas perskirstyti mineralus ir kitas maistines medžiagas šakniastiebiams, sumažina trąšų poreikį rudenį. Kiekvienais metais šakniastiebiai užaugina naujus ūglius, kurie pilnai subręsta per 3 – 4 metus ir taip 15 metų duoda didžiausią derlių. Lyginant su kukurūzais (*Zea mays*), *M. giganteus* vegetacijos laikotarpį ilgesnį laiką auga šaltesnio klimato regionuose, nes geba vykdyti fotosintezę esant 6°C laipsnių temperatūrai

žemiau nulio (Juvik et al., 2010), tačiau Rugienius ir kt. (2008) teigia, kad drambliažolė (*Miscanthus*), nėra pakankamai atspari šalčiui.

Didelį biomasės produktyvumą lemia tai, kad drambliažolė yra C4 fotosintezės augalas, kuriam būdingas didesnis anglies fiksacijos kiekis, efektyvesnis maistinių medžiagų ir vandens ir sunaudojimas (Ahonsi et al., 2013). C4 augalai yra vieni produktyviausių ir perspektyviausių augalų, celiuliozinei biodegalų žaliavai (Zhao et al., 2013). *Miscanthus* geriau konvertuoja šviesos energiją, lyginant su C3 tipo augalais (Lee et al., 2012).

Intensyvūs tyrimai Europoje parodė, kad *Miscanthus* hibridai netoleruoja žemų temperatūrų, tačiau peržiemojimą ir augalų augimą pagerina šiaudų ar kitokio mulčo panaudojimas pirmųjų metų rudenį. Todėl sekančiais metais augalai suformuoja stiprią šaknų sistemą dirvoje, siekiančią 3–4 metrų gylį ir 15–25 t ha⁻¹ šakniastiebių sausosios biomasės, tuo pačiu praturtindami dirvožemį N, P, K ir Mg elementais. Tačiau Lietuvoje šie augalai dažnai nukenčia nuo vėlyvųjų pavasario šalnų, dirvožemio sausros ir vėjų (Kryževičienė ir kt., 2011).

1.3. Morfogenezė

Per pastaruosius keturis dešimtmečius, buvo plačiai tirta daugybė veiksnių, įtakojančių augalų morfogenezės reguliavimą. Manoma, kad augalų augimo pokyčius inicijuoja skirtingas augalo hormonų santykis, pvz: auksinų ir citokininų (Murch et al., 2001; Ashikari, et al., 2009).

Augalų morfogenezė *in vitro* indukuojama dviem būdais, per somatinę embriogenezę arba organogenezę. Abu morfogenezės keliai gali būti vykdomi tiesiogiai be kaliaus tarpinio etapo, arba netiesiogiai, kai organų ir augalų regeneracija vyksta per kalių, kitaip dar vadinama *de novo* (Phillips, 2004). Somatinėje embriogenezėje, ant eksplanto sudaro pumpurai, šaknys, somatiniai gemalai. Somatinės ląstelės gali diferencijuotis ir susidaryti gemalines struktūras, primenančias zigotinį gemalą (Ramage, Williams, 2002). Totipotentškumo realizacija priklauso nuo augalo donoro genetinės informacijos ir jo augimo sąlygų, nuo eksplanto audinių fiziologinių charakteristikų ir eksplanto auginimo aplinkos sąlygų (Wernet et al., 2003; Duchovskis, 2006).

Taikant įvairias kultūras galima optimizuoti somatinių embrionų dažnį, kurie yra bipolinės struktūros, nes turi tiek ūglių, tiek šaknų ašis (Phillips, 2004). Priešingai nei somatinėje embriogenezėje, organogenezėje vyksta organų susidarymo procesas. Organai kultūrose gali susidaryti įvairiais būdais iš meristemų, įneštų su eksplantu, iš audinių, kurie neturi meristeminių ląstelių grupių (tarpambliai, lapalakščiai, lapkočiai, šaknies tįsimo zonos ląstelės) (Ramage, Williams, 2002).

Siekiant inicijuoti ūglių organogenezę – didelė auksinų ir citokininų koncentracija, somatinę embriogenezę – didelė auksinų koncentracija (dažniausiai – 2,4-dichlorfenilacto rūgštis), o šaknų organogenezės iniciacijai, vidutinė ir aukšta auksinų koncentracijos. Geresniam rezultatui pasiekti naudojami kuo natūralesni auksinų šaltiniai. Regeneruoti organai yra vienpoliai, su dviem skirtingomis organogenezės indukcijų signalais – vienas signalas inicijuoti ūglį, o kitas signalas inicijuoti šaknų organogenezę, priešingai nei bipolinio somatinio embriono, kuris inicijuoja vieną indukcijos signalą (Phillips, 2004).

Kalius yra neorganizuotas audinys, kurį sudaro dediferencijuotos ląstelės. Kaliaus kultūra naudojama ląstelių vystymosi ir augalų morfogenezės tyrimuose. Natūraliai kalius atsiranda ant *in vivo* užgyjant įvairiems pažeidimams. (Sliesaravičius, Stanys, 2005).

Organogenezei *in vitro* pasiekti, skirtingiems augalų eksplantams reikalingi augimo reguliatoriai, ypač citokininai (Butiuc-Keul et al., 2005). Hirsch, Fang. (1994) teigia: kad organogenezė priklauso nuo auksinų ir citokininų santykio.

Augalų dauginimas per kalių vyksta organogenezės arba embriogenezės keliu (Petersen, 1997). Kaliaus kultūros regeneracija per somatinę embriogenezę buvo gauta daugelyje miglinių šeimos rūšių. Kaliaus indukcijai geriausi rezultatai gaunami tik iš jaunų nesubrendusių audinių turinčių eksplantų, nes kuo senesnis eksplantas tuo labiau audiniai prarandą gebėjimą formuoti kalių (Holme, Petersen, 1996). Kaliaus indukcija priklauso nuo eksplanto tipo, bei jo išsivystymo stadijos (Chen et al., 2012).

Rizogenezė – padauginimo būdas naudojant viršutinius arba pridėtinius pumpurus (Marks, 1996). Šaknų regeneracija priklauso nuo daugelio veiksnių, tokių kaip genotipas, eksplanto tipas, maitinamoji terpė, augimo reguliatorių ir fizikinių savybių (Aoun et al., 2008).

1.4. Morfogenezę lemiantys veiksniai

Augalų dauginimas *in vitro* – svarbus ir populiarus būdas padauginti augalus, kurie natūraliai nesubrandina sėklų arba dauginasi tik vegetatyviškai. Mikrodauginimas suteikia unikalią galimybę, lyginant su tradiciniais dauginimo būdais, per trumpą laiką išauginti daug augalų, užtikrinti genetinį vienodumą bei greitai sukurti naujas veisles, gauti devirusuotus augalus. Augalai gali būti dauginami ištisus metus. Tačiau mikrodauginimą apriboja dideli investicijų poreikiai bei augalų rūšių pasirinkimas (Govil, Gupta, 1997).

Pagrindiniai veiksniai įtakojantys morfogenezę yra augalų augimo reguliatoriai ir jų koncentracija (ypač auksinų), eksplanto pasirinkimas, maitinamosios terpės sudėtis (ypač neorganiniai ir organiniai azoto šaltiniai, angliavandenių šaltiniai ir jų koncentracijos),

maitinamosios terpės konsistencija (skysta ar pusiau kieta), terpės pH, drėgmė, apšvietimas, šviesos intensyvumas, temperatūra (Phillips, 2004).

GENOTIPAS. Ląstelių dauginimo efektyvumas *in vitro* dažniausiai priklauso nuo genotipo. Todėl labai svarbu surinkti kuo platesnį genotipų asortimentą iš įvairių vietų, kad gauti tikslius *in vitro* rezultatus (Abe et al., 2011). Taip pat genotipo skirtumai gali būti susiję su skirtingu endogeninių hormonų kiekiu. Dėl besiskiriančio endogeninių hormonų kiekio, izoliuoti eksplantai iš to paties genotipo nevienodai reaguoja *in vitro* kultūroje. Šis balansas gali būti eliminuotas auginant donorinius augalus optimaliomis sąlygomis bei keičiant augimo reguliatorių ir kitų maitinamųjų terpių komponentų sudėtį (Kaizuma et al., 1994).

EKSPLANTAS. Eksplanto amžius gali nulemti kultūros sėkmę, nes kuo eksplantas yra jaunesnis, tuo geriau jis geba formuoti įvairias struktūras *in vitro*. Kultūros sėkmę taip pat lemia ir eksplanto dydis – didesni vystosi produktyviau, nes turi sukaupę didesnę maisto medžiagų, bei augimo reguliatorių kiekį. Eksplantai turi būti izoliuojami iš augalų nepažeistų ligų ir kenkėjų (Khehra, Mathias, 1992).

MAITINAMOJI TERPĖ. Augalų audiniai ir organai *in vitro* auginami ant dirbtinių terpių, kurios papildytos maistinėmis medžiagomis būtinomis augalui vystytis ir augti. Augalų audinių kultūros dauginimo sėkmė priklauso nuo pasirinktos maitinamosios terpės. Kad augalas būtų sveikas ir sparčiai augtų, jis turi gauti gana didelį kiekį tam tikrų neorganinių elementų: azoto jonų, kalio, kalcio, fosforo, magnio ir sieros. Taip pat maitinamoji terpė turi būti papildyta mažais kiekiais kitų mikroelementų: geležies, mangano, cinko, boro, vario ir molibdeno. Dažniausiai naudojama augalų regeneracijai iš izoliuotų audinių ir kaliaus maitinamoji terpė yra T. Murashige ir F. Skoog (MS) (1962) (George et al., 2008).

AUGIMO REGULIATORIAI. Sintetiniai junginiai, kurie veikia kaip natūralūs augalų hormonai vadinami – augalų augimo reguliatoriais. Auksinai, absciso rūgštis, citokininai, etilenas ir giberilinas žinomi, kaip penki pagrindiniai augalų hormonai. Auksinai, citokininai ir citokininų ir auksinų derinys, reguliuoja diferenciaciją ir morfogenezę procesus (Gaspar et al., 1996; Kende, Zeevaer, 1997).

AUKSINAI. Tiek *in vitro* tiek *in vivo* sistemose, buvo nustatyta, kad auksinai nors ir mažomis koncentracijomis, yra būtini augalų fiziologiniuose procesuose (Murch et al., 2001). Audinių ir ląstelių kultūrose auksinai su citokininais kontroliuoja diferenciaciją ir morfogenezę procesus (Gaspar et al., 1996). Pagrindinis auksinas sintetinamas augale yra 3-indolilacto rūgštis (IAR) (Gaspar et al., 1996; Kende, Zeevaer, 1997; Calderon, 2009; Anusevičiūtė ir kt., 2013). Tačiau natūralus auksinas IAR, ruošiant maitinamąsias terpes naudojamas retai, dažniau naudojami jo analogai. Iš sintetinių auksinų plačiausiai naudojami

a-naftilacto rūgštis (NAR), 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D) ir 3-indolilsviesto rūgštis (ISR) (Gaspar et al., 1996). Auksinai dalyvauja augalo audinių vystymesi. Jie, skatina ląstelių tįsimą ir augimą, ląstelių dalijimąsi, diferenciaciją, stimuliuoja šaknų susidarymą, slopiną augalo lapų senėjimą, susiję su augalų fototropiniais judesiais, slopina vaisių ir lapų senėjimą, stimuliuoja kaliaus kultūroje šaknų ar stiebo pradmenų diferenciaciją (Berleth, Sachs, 2001).

CITOKININAI. Citokininai skatina ląstelių dalijimosi, diferenciacijos ir organogenezės procesus, stimuliuoja audinių senėjimo procesų stabdymą, indukuoja viršutinių ir pridėtinių pumpurų vystymąsi, skatina chlorofilo sintezę. Citokininas (N^6 -2-izopentil) adeninas yra pirmtakas visų citokininų formų (Nielsen et al., 1993; Kende, Zeevaer, 1997). Dažniausiai maitinamosiose terpėse naudojami citokininai: (BAP) 6-benzylaminopurinas, (2iP) N^6 -2izopentil adeninas, zeatinas ir kinetinas.

GIBERILINAS. Šie hormonai aktyviai sintetinami audiniuose ir kontroliuoja augalo augimą ir vystymąsi (Gaspar et al., 1996).

Šiuo metu yra žinoma apie 90 giberilinių, kurie savo chemine sandara mažai skiriasi. Dažniausias iš jų – GR_3 . Giberilinių pagrindinė savybė – skatinti žydėjimą. Taip pat jie labai svarbūs dykstančioms sėkloms. Giberiliniai yra augalų hormonai, slopinantys šaknų augimą, nes stimuliuoja antžeminių dalių augimą.

ABSCIZO RŪGŠTIS. Abscizo rūgštis dalyvauja augalo augime ir vystymesi, įskaitant sėklų dygimą, embrioninį brendimą, lapų senėjimą, žiotelių prisitaikymą prie aplinkos sąlygų. Absizo rūgštis yra augimo inhibitorė, giberilinių antagonistė. Ši medžiaga modifikuoja citokininų sintezę, dalyvauja baltymų sintezėje, laikoma augalų perėjimo į ramybės būklę reguliatoriumi. Audinių kultūroje abscizo rūgštis naudojama somatinės embriogenezės indukcijoje (Kende, Zeevaer, 1997).

ETILENAS. Etilenas – augimo reguliatorius, skatinantis vaisių nokimą, žiedų ir lapų senėjimą (Gaspar et al., 1996); taip pat jis yra stiprus inhibitorius (Hirsch, Fang, 1994). Etilenas didina citoplazmos laidumą deguoniui, kuris patekęs į ląstelių vidų, skatina oksidaciją, ko pasekoje suyra rauginės medžiagos ir organinės rūgštys. Audinių kultūroje etileno sintezę skatina žaizdos ir auksinai. Etilenas skatina senėjimą ir yra nepageidaujamas kultūroje (Gaspar et al., 1996).

Tarp augalų hormonų etilenas yra unikalus tuo, kad jis yra dujinės konsistencijos. Jis yra paprastas angliavandenis (C_2H_4) įtakojantis augimą, diferenciaciją ir skatinantis senėjimo procesus augale. Etilenas susidaro audinių kultūrose, tačiau jo susidarymo kiekis skiriasi nuo kultūros augimo stadijos, nuo naudojamų augimo reguliatorių ir nuo tiriamo augalo. Etilenas susidaro visose augalo dalyse nuo mechaninių sužalojimų ar streso poveikio, tokio kaip,

švelnaus patrynimo, patogeninių mikroorganizmų, vandens pertekliaus arba jo trūkumo (Kumar et al., 1998).

AGARAS. Agaras yra plačiai naudojami audinių kultūrų terpėje. Tačiau jų tikslus veikimas ir funkcionavimas yra nežinomi. Agaras yra jūros dumblių derinys, aukštos molekulinės masės polisacharidas (Petersen et al., 1999; Mohamed-Yasseen, 2001).

SACHAROZĖ. Gyvoms augalo ląstelėms, angliavandeniai yra būtini, kaip energijos šaltinis, o anglis – biosintezei. Aprūpinimas angliavandeniais yra labai svarbus, norint išauginti augalus *in vitro*. Šie junginiai taip pat reikalingi terpėje kaip osmoso agentai (Amiri, Kazemitabar, 2011). Dėl šių priežasčių, angliavandeniai turi didelį poveikį ląstelių fiziologijai, augimui ir diferencijacijai, todėl būtina palaikyti optimalų anglies šaltinio kiekį kaliaus indukcijai ir augalų regeneracijai (Petersen et al., 1999; Amiri, Kazemitabar, 2011).

2. TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

Tyrimo vieta. Tyrimai atlikti 2012 – 2013 metais Aleksandro Stulginskio universiteto Biologijos ir augalų biotechnologijos institute ir Agrobiotechnologijos laboratorijoje.

Tyrimo objektas. Drambliažolė *Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deuter (2.1 pav.)



2.1 pav. Drambliažolės *Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deuter donorinis augalas

Donorinių augalų auginimo sąlygos. Drambliažolė *Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deuter. Donoriniai augalai auginti vegetaciniuose induose auginimo kambaryje kontroliuojamomis sąlygomis: šviesos intensyvumas $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodas 16/8 (dieną/naktį), temperatūra 22/18°C (dieną/naktį).

Eksplantų sterilinimas ir auginimo sąlygos. Drambliažolės šaknys ir šakniastiebiai 60 min. plauti po tekančiu vandeniu, 60 s. sterilinti 70 proc. etanolio vandeniniame tirpale ir 3 min 10 proc. natrio hipochlorito tirpale, po to 3 kartus po 5 min. plauti steriliame distiliuotame vandenyje.

2.1. Augimo reguliatorių parinkimas *Miscanthus* × *giganteus* kaliaus indukcijai ir organogenezei

Sterilūs šaknų ir šakniastiebių eksplantai supjaustyti 1,0 – 1,5 cm ilgio segmentais ir auginti Murashige ir Skoog (MS) (Murashige, Skoog, 1962) maitinamojoje terpėje (2.1.1 lentelė) su skirtingais augimo reguliatorių kiekiais.

2.1.1. Tirtas skirtingas 6-benzilaminopurino (BAP) ir α naftilacto rūgšties rūgšties (NAR) derinių poveikis drambliažolės kaliaus indukcijai ir organogenezei:

- (kontrolė) be augimo reguliatorių
- 0,1 mg l⁻¹ BAP + 1,5 mg l⁻¹ NAR
- 0,1 mg l⁻¹ BAP + 3,0 mg l⁻¹ NAR
- 0,1 mg l⁻¹ BAP + 4,5 mg l⁻¹ NAR
- 0,2 mg l⁻¹ BAP + 1,5 mg l⁻¹ NAR
- 0,2 mg l⁻¹ BAP + 3,0 mg l⁻¹ NAR
- 0,2 mg l⁻¹ BAP + 4,5 mg l⁻¹ NAR

2.1.2. Tirtas skirtingas Tidiazurono (TDZ) ir α naftilacto rūgšties rūgšties (NAR) derinių poveikis drambliažolės kaliaus indukcijai ir organogenezei:

- be augimo reguliatorių (kontrolė)
- 0,05 mg l⁻¹ TDZ + 1,5 mg l⁻¹ NAR
- 0,05 mg l⁻¹ TDZ + 3,0 mg l⁻¹ NAR
- 0,05 mg l⁻¹ TDZ + 4,5 mg l⁻¹ NAR
- 0,1 mg l⁻¹ TDZ + 1,5 mg l⁻¹ NAR
- 0,1 mg l⁻¹ TDZ + 3,0 mg l⁻¹ NAR
- 0,1 mg l⁻¹ TDZ + 4,5 mg l⁻¹ NAR

Maitinamoji terpė papildyta 30 g l⁻¹ sacharozės ir 8 g l⁻¹ Difco Bacto agaru. Terpės pH – $5,7 \pm 0,1$. Maitinamoji terpė autoklavuota 115°C temperatūroje 30 min., išpilstyta po 20 ml į 90 mm skersmens Petri lėkšteles ir užsandarinta parafilnu.

Izoliuoti eksplantai *in vitro* auginti 22 ± 2 °C temperatūroje, esant 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apšvietimui, 16/8 h (diena/naktis) fotoperiodui.

2.2. Aukšinių parinkimas *Miscanthus* $\times$ *giganteus* mikroūglių rizogenezei

Po 35 auginimo dienų, iš šakniastiebių susiformavę mikroūgliai perkelti į MS (makro druskų) terpę, papildytą skirtingais aukšinių kiekiais.

2.2.1 Tirtas auksino NAR skirtingų koncentracijų poveikis drambliažolės rizogenezei:

- be augimo reguliatorių (kontrolė)
- 0,1 mg l⁻¹ NAR
- 0,2 mg l⁻¹ NAR
- 0,3 mg l⁻¹ NAR
- 0,4 mg l⁻¹ NAR

2.2.2 Tirtas auksino IAR (3-indolilacto rūgšties) skirtingų koncentracijų poveikis drambliažolės rizogenezei:

- be augimo reguliatorių (kontrolė)
- 0,1 mg l⁻¹ IAR
- 0,2 mg l⁻¹ IAR
- 0,3 mg l⁻¹ IAR
- 0,4 mg l⁻¹ IAR

Maitinamoji terpė papildyta 10 g l⁻¹ sacharozės ir 8 g l⁻¹ Difco Bacto agaru. Terpės pH – 5,7 ± 0,1. Maitinamoji terpė autoklavuota 115°C temperatūroje 30 min., išpilstyta po 5 ml į mėgintuvėlius.

Sterili kultūra auginta kontroliuojamomis sąlygomis: šviesos intensyvumas – 50 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperiodas – 16/8 h (dieną/naktį), aplinkos temperatūra 22 ± 2 °C.

Eksperimento metu auginta po 60 kiekvieno varianto eksplantų, tyrimas atliktas trimis pakartojimais. Kas keturias savaites eksplantai perkelti į šviežią tos pačios sudėties maitinamąją terpę.

Morfogeninė somatinio audinio potencialą įvertinta analizuojant eksplante susiformavusių struktūrų morfologinius parametrus. Vertinta:

- ✓ kaliaus susiformavimo dažnis (proc.);
- ✓ ūglių susiformavimo dažnis (proc.);
- ✓ šaknų susiformavimo dažnis (proc.);

Statistinė duomenų analizė. Duomenys statistiškai apdoroti kompiuterinėmis programomis STAT 1,55 ir ANOVA iš programų paketo “SELEKCIJA“ Tarakanovas, Raudonius, 2003).

2.1.1 lentelė. Murashige ir Skoog (MS) maitinamosios terpės sudėtis

Medžiaga	Kiekis mg l ⁻¹
Makroelementai	
NH ₄ NO ₃	1650
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	–
KNO ₃	1900
KCl	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
Na ₂ SO ₄	–
12H ₂ PO ₄	170
NaH ₂ PO ₄ ·4H ₂ O	–
NaH ₂ PO ₄	–
Mikroelementai	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
MnSO ₄ ·H ₂ O	–
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ ·H ₂ O	8,6
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
Fe (SO ₄) ₃	–
Na ₂ EDTA·H ₂ O	37,3
Vitaminai	
Mezoinozinas	100
Tiaminas HC1	0,1
Porodoksolis HC1	0,5
Nikotino rūgštis	0,5
Glicinas	2
Priedai	
Sacharozė	10000
Agaras	8000
pH 5,7 ± 0,1	

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ

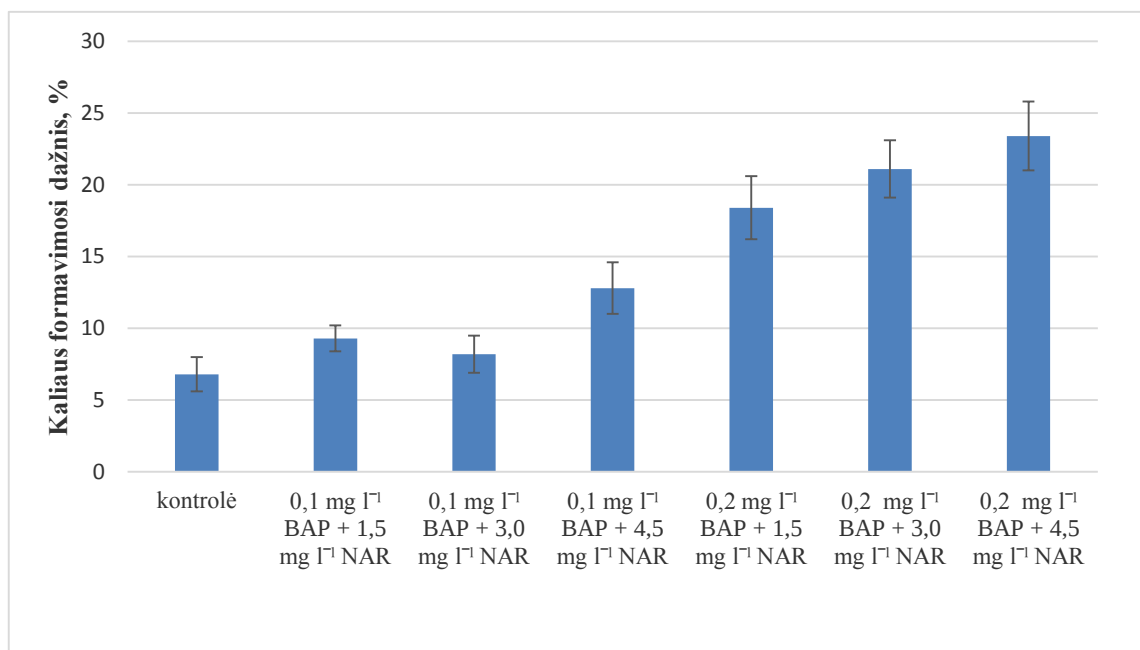
3.1. Drambliažolės kaliaus indukcija

Izoliuotų drambliažolės audinių ląstelių dediferenciacijos procesas prasidėjo 21 – 28 dieną po šaknų izoliavimo (3.1.1 pav.).



3.1.1. pav. *Miscanthus x giganteus* kaliaus genezė *in vitro*

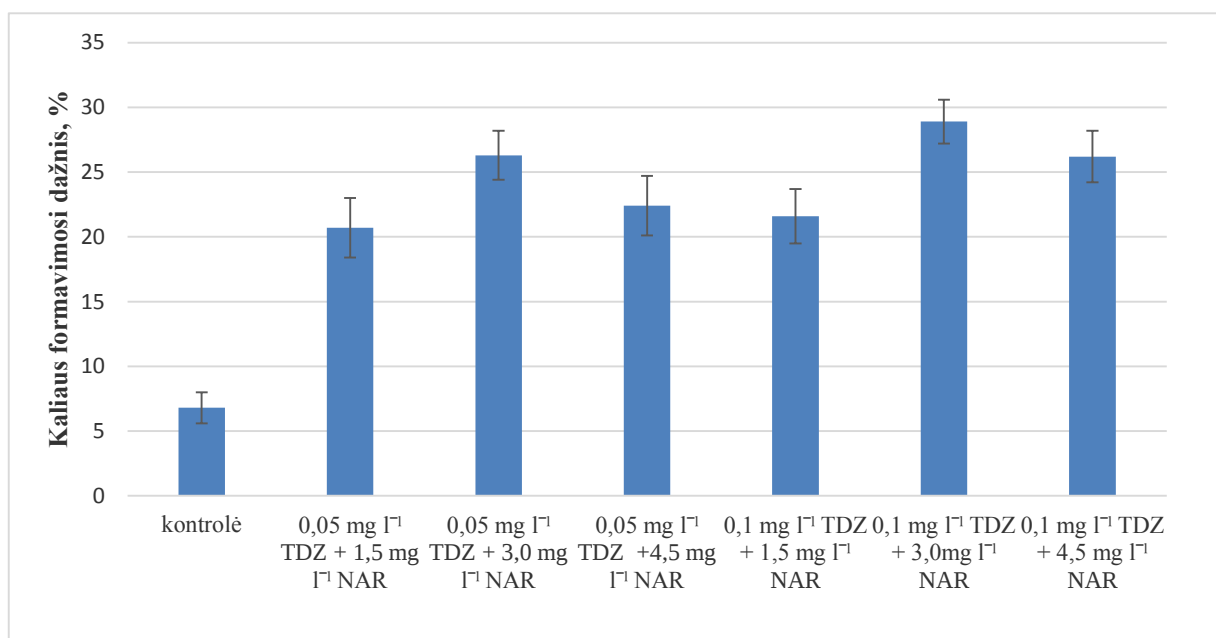
Drambliažolės šaknų eksplantai kalių formavo visose tirtose MS maitinamosiose terpės variantuose (3.1.2 pav.). Maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių kalių formavo 6,8 proc. šaknų. Papildžius morfogenezei terpę 0,1 mg l⁻¹ BAP + 1,5 mg l⁻¹ NAR, kaliaus susiformavimo dažnis padidėjo neesmingai iki 9,3 proc. Padidinus NAR koncentraciją nuo 1,5 mg l⁻¹ iki 3,0 mg l⁻¹ derinyje su 0,1 mg l⁻¹ BAP kaliaus susiformavimo dažnis sumažėjo iki 8,2 proc. Tolesnis šio auksino koncentracijos didinimas turėjo teigiamą įtaką drambliažolės šaknų kaliaus iniciacijai, lyginant su terpe, papildyta 0,1 mg l⁻¹ BAP + 1,5 mg l⁻¹ NAR, skirtumai esminiai. Nustatyta, kad citokininų ir auksinų derinys 0,2 mg l⁻¹ BAP + 4,5 mg l⁻¹ NAR skatino kaliaus genezę, šaknų eksplantai kalių formavo intensyviausiai (23,4 proc. dažniu).



3.1.2 pav. Augimo reguliatorių BAP ir NAR poveikis drambliažolės kaliaus indukcijai izoliuotų šaknų kultūroje

ASU Agrobiotechnologijos laboratorija, 2013 – 2014 m.

Rezultatai, gauti tiriant augimo reguliatorių derinių poveikį drambliažolės kaliaus indukcijai izoliuotų šaknų kultūroje, pateikti 3.1.3 pav.



3.1.3 pav. Augimo reguliatorių TDZ ir NAR poveikis drambliažolės kaliaus indukcijai izoliuotų šaknų kultūroje

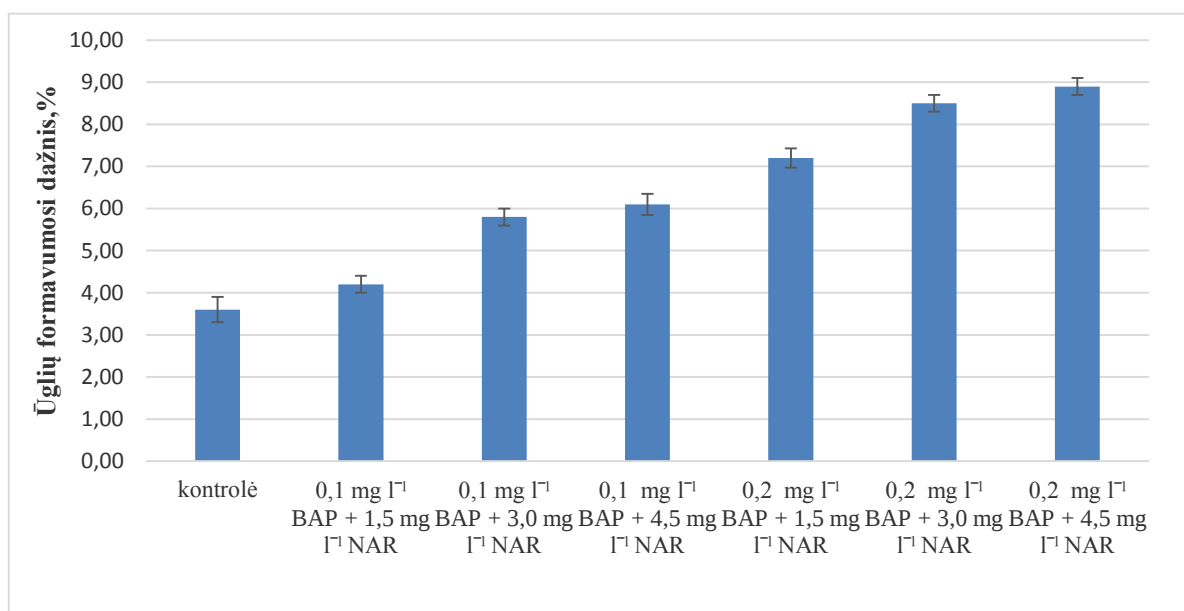
ASU Agrobiotechnologijos laboratorija, 2013 – 2014 m.

Priklausomai nuo indukcijos terpės sudėties, kaliaus formavimosi dažnis varijavo nuo 6,8 iki 28,9 proc. Padidintas citokinino kiekis indukcijos terpėje skatino izoliuotų drambliažolės šaknų kaliaus genezę. Papildžius indukcijos terpę $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ + $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAR kaliaus susiformavimo dažnis padidėjo esmingai 20,7 proc., taip pat derinyje su $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ NAR, $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ kaliaus susiformavimo dažnį padidino esmingai. Intensyviausiai 28,9 proc. dažniu kalių formavo izoliuoti segmentai auginti terpėje su $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ + $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ NAR. Tirti citokininų ir auksinų deriniai ($0,05 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ + $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ NAR, $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ + $4,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAR) skatino drambliažolės šaknų kaliaus indukciją, kalius formavosi atitinkamai 26,3 ir 26,2 dažniu.

Citokinino TDZ ir auksino NAR poveikyje izoliuotų šaknų segmentų ląstelių dediferenciacija vyko statistiškai patikimai didesniu dažniu, lyginant su tirtais BAP ir NAR deriniais. Daugiausiai (28,9 proc.) kaliaus susiformavo maitinamojoje terpėje, papildytoje $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ ir $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ NAR.

3.2. Dramblyžolės organogenezė

Maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių ūglius formavo vidutiniškai 3,6 proc. šakniastiebių (3.2.1 pav.).

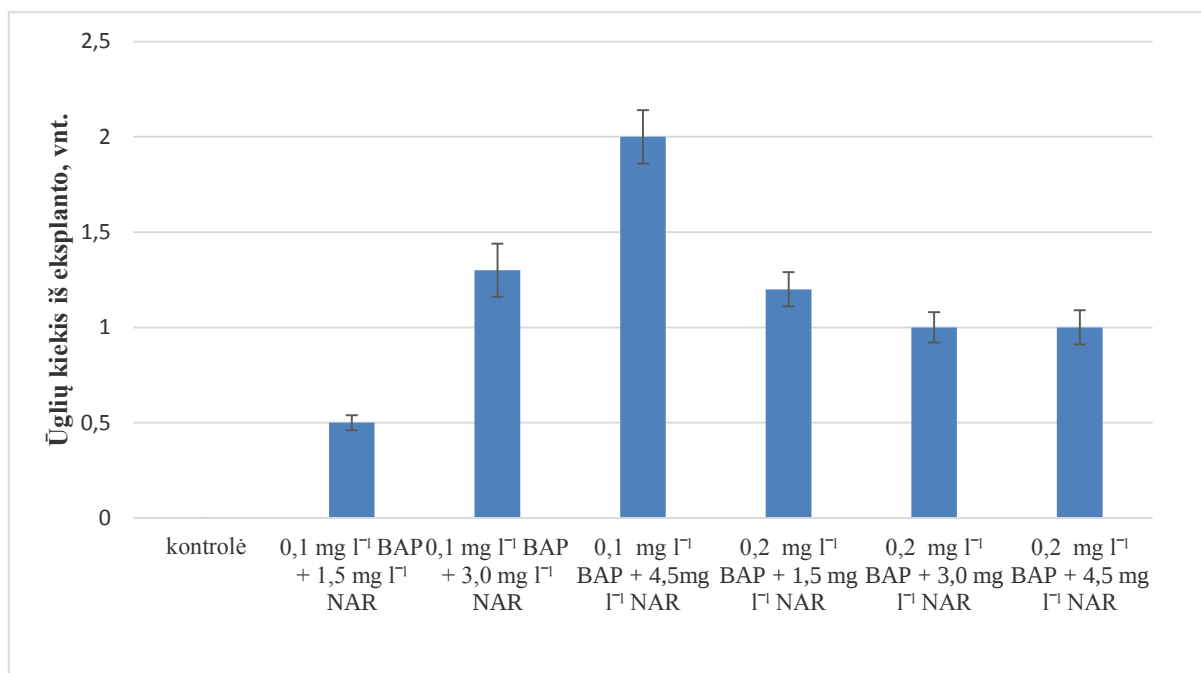


3.2.1 pav. Augimo reguliatorių BAP ir NAR poveikis dramblyžolės ūglių formavimosi dažniui izoliuotų šakniastiebių kultūroje

ASU Agrobiotechnologijos laboratorija, 2013 – 2014 m.

Papildžius indukcijos terpę $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BAP + $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAR deriniu, ūglių susiformavimo dažnis padidėjo iki 4,2 proc. ir tolesnis šios koncentracijos didinimas turėjo teigiamą įtaką. Didinant NAR koncentraciją derinyje su $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BAP ūglių formavimosi dažnis nuosekliai didėjo iki 6,1 proc. Padidinus BAP koncentraciją nuo $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ iki $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ derinyje su $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAR izoliuoti šakniastiebiai ūglius formavo 7,2 proc. dažniu. Tolesnis šių auksinų koncentracijos didinimas turėjo teigiamą įtaką drambliažolės ūglių formavimuisi. Daugiausiai (8,9 proc. dažniu) ūglius suformavo drambliažolės šakniastiebių eksplantai terpėje, papildytoje $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ BAP + $4,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAR.

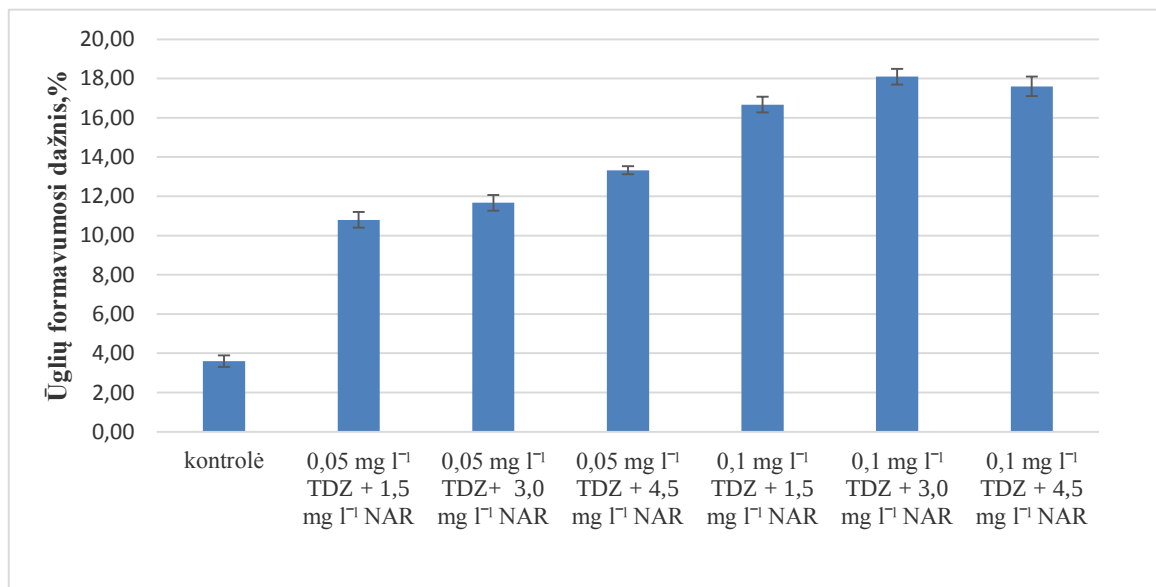
Papildžius maitinamąją terpę $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BAP + $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ NAR deriniu, izoliuoti šakniastiebių eksplantai vidutiniškai suformavo 1,3 ūglius iš eksplanto (3.2.2 pav.). Tolesnis šių auksinų koncentracijos didinimas turėjo teigiamą įtaką drambliažolės ūglių formavimuisi išėigai. Didžiausias ūglių kiekis iš eksplanto (2 vnt.) gautas maitinamojoje terpėje, papildytoje $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BAP + $4,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAR deriniu. Padidinus BAP koncentraciją nuo $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ iki $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ derinyje su $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAR ūglių kiekis iš eksplanto sumažėjo iki 1,2 vnt. Nustatyta, kad maitinamojoje terpėje, papildytoje $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ BAP + $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ NAR ir $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ BAP + $4,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAR, ūglių kiekis iš eksplanto gautas vienodas 1 vnt



3.2.2 pav. Augimo reguliatorių BAP ir NAR poveikis drambliažolės ūglių išėigai izoliuotų šakniastiebių kultūroje

ASU Agrobiotechnologijos laboratorija, 2013 – 2014 m.

Maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių ūglius formavo vidutiniškai 3,6 proc. šakniastiebių (3.2.3 pav).



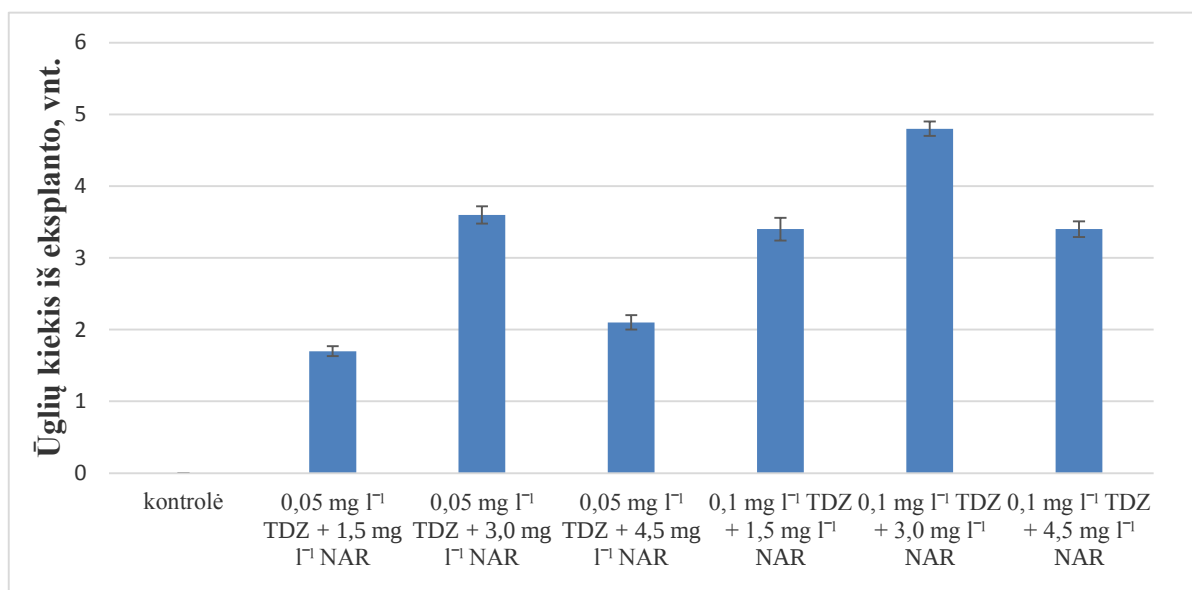
3.2.3 pav. Augimo reguliatorių TDZ ir NAR poveikis drambliažolės ūglių formavimosi dažniui izoliuotų šakniastiebių kultūroje

ASU Agrobiotechnologijos laboratorija, 2013 – 2014 m.

Papildžius indukcijos terpę 0,05 mg l⁻¹ TDZ + 1,5 mg l⁻¹ NAR, ūglių susiformavimo dažnis siekė 10,8 proc. Didinant NAR koncentraciją derinyje su 0,1 mg l⁻¹ TDZ ūglių formavimo dažnis nuosekliai didėjo iki 13,33 proc. Padidinus TDZ koncentraciją nuo 0,05 mg l⁻¹ iki 0,1 mg l⁻¹ derinyje su 1,5 mg l⁻¹ NAR izoliuoti šakniastiebių segmentai ūglius formavo 16,67 proc. dažniu. intensyviausiai (18,1 proc. dažniu) ūglius formavo drambliažolės šakniastiebių eksplantai terpėje, papildytoje 0,1 mg l⁻¹ TDZ + 3,0 mg l⁻¹ NAR. Maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,1 mg l⁻¹ TDZ + 4,5 mg l⁻¹ NAR, ūglius formavo atitinkamai 17,6 proc. šakniastiebių.

Rezultatai, gauti įvertinus augimo reguliatorių derinių poveikį ūglių kiekiui iš eksplanto pateikti 3.2.4 pav. Nustatyta, kad maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių drambliažolės izoliuoti šakniastiebiai ūglių neformavo. Mažiausias (1,7 vnt.) ūglių kiekis iš eksplanto gautas terpėje, papildytoje 0,05 mg l⁻¹ TDZ + 1,5 mg l⁻¹ NAR deriniu. Papildžius maitinamąją terpę 0,05 mg l⁻¹ TDZ + 3,0 mg l⁻¹ NAR deriniu, ūglių kiekis iš eksplanto padidėjo iki 3,6 vnt. Tolesnis auksino NAR koncentracijos didinimas turėjo neigiamą įtaką drambliažolės ūglių formavimosi išėigai. Maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,1 mg l⁻¹ TDZ + 4,5 mg l⁻¹ NAR, ūglių kiekis iš eksplanto atitinkamai padidėjo iki 3,4 vnt. Padidinus TDZ koncentraciją nuo 0,05 mg l⁻¹ iki 0,1 mg l⁻¹ derinyje su 1,5 mg l⁻¹ NAR vidutiniškai eksplantai suformavo iki 3,4

ūglių iš eksplanto. Didžiausias ūglių kiekis iš eksplanto (4,8 vnt.) gautas maitinamojoje terpėje papildytoje 0,1 mg l⁻¹ TDZ + 3,0 mg l⁻¹ NAR deriniu.



3.2.4 pav. Augimo reguliatorių TDZ ir NAR poveikis drambliažolės ūglių išeigai izoliuotų šakniastiebių kultūroje

ASU Agrobiotechnologijos laboratorija, 2013 – 2014 m.

Tiesioginė organogenezė iš drambliažolės šakniastiebių eksplantų pastebėta po 21 – 22 dienų (3.2.5 pav.).

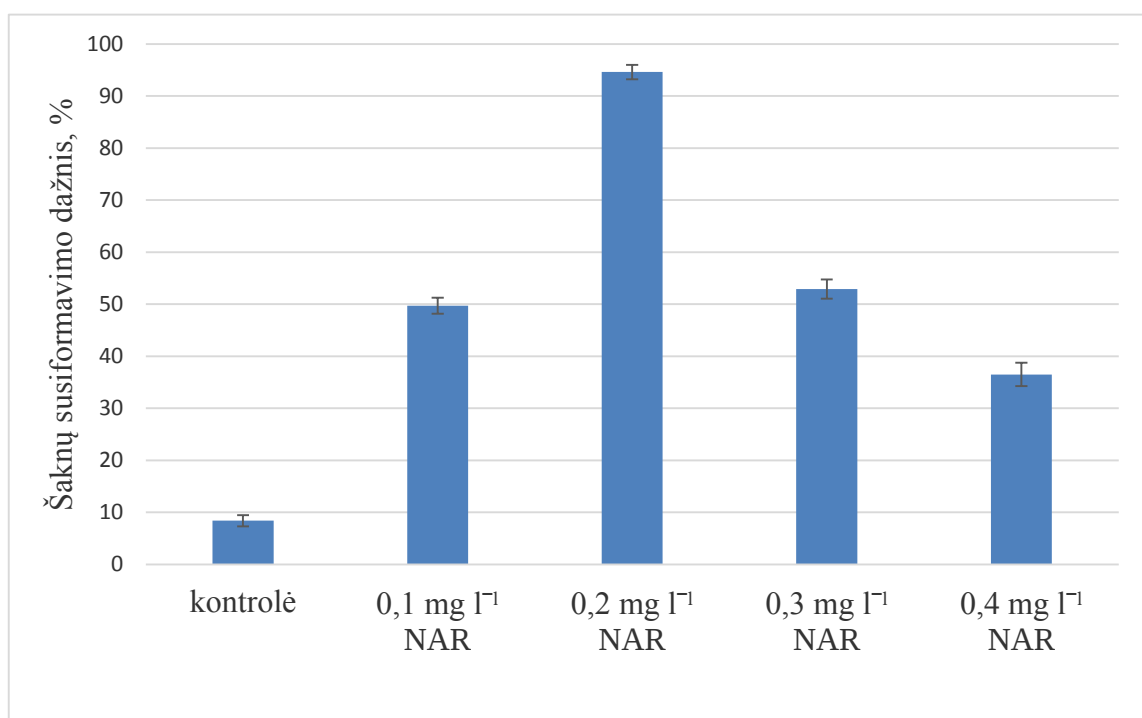


3.2.5 pav. *Miscanthus x giganteus* organogenezė in vitro

Tiriant egzogeninių veiksnių poveikį drambliažolės morfogenezei *in vitro* nustatyta, kad pridėtinių ūglių išeiga priklausė nuo augimo reguliatorių derinio bei koncentracijos maitinamojoje terpėje. Literatūroje teigiama, kad ūglių inicijavimą galima įtakoti tinkamai subalansavus auksinų ir citokininų priedą maitinamojoje terpėje (Coleman et al., 2003). Drambiliažolės izoliuotų šakniastiebių kultūroje didžiausias ūglių kiekis iš eksplanto 4,8 gautas maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,1 mg l⁻¹ TDZ + 3,0 mg l⁻¹ NAR deriniu, mažiausias ūglių kiekis iš eksplanto gautas terpėje, papildytoje 0,1 mg l⁻¹ BAP + 1,5 mg l⁻¹ NAR deriniu. Tyrimais nustatyta, kad drambliažolės izoliuotų šakniastiebių kultūroje intensyviausiai pridėtiniai ūgliai regeneravo terpėje, papildytoje citokininu TDZ. Esminiai skirtumai nustatyti maitinamojoje terpėje papildytoje 0,2 mg l⁻¹ BAP + 3,0 mg l⁻¹ NAR ir 0,2 mg l⁻¹ BAP + 4,5 mg l⁻¹ NAR ūglių išeiga iš eksplanto buvo vienoda (1 vnt.).

3.3. Drambiliažolės rizogenezė

Maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių šaknis formavo vidutiniškai apie 8 proc. mikroūglių (3.3.1 pav.). Papildžius rizogenezės terpę 0,1 mg l⁻¹ NAR, šaknų susiformavimo dažnis siekė 49,7 proc., lyginant su kontrole, šaknis suformavo beveik 40 proc. daugiau mikroūglių, skirtumai esminiai ir statistiškai patikimi.

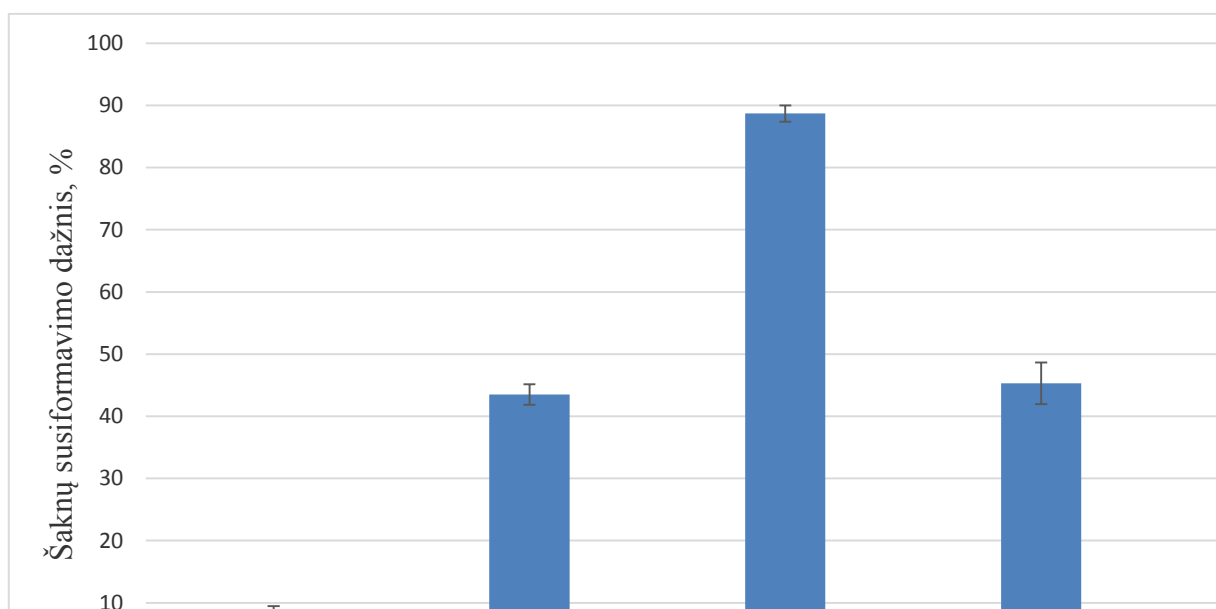


3.3.1 pav. Auksino NAR poveikis drambliažolės mikroūglių įsišaknijimo dažniui

ASU Agrobiotechnologijos laboratorija, 2013 – 2014 m.

NAR koncentracijos padidinimas iki $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ sąlygojo dar intensyvesnį šaknų susidarymo procesą – šaknis formavo apie 95 proc. mikroūglių. Tolesnis šio auksino koncentracijos didinimas turėjo neigiamą įtaką drambliažolės mikroūglių išaknydinimui, lyginant su terpe, papildyta $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ NAR. Maitinamojoje terpėje, papildytoje $0,3 \text{ mg l}^{-1}$ NAR ir $0,4 \text{ mg l}^{-1}$ NAR, šaknis formavo atitinkamai 52,9 proc. ir 36,5 proc. mikroūglių.

Auksino IAR priedas maitinamojoje terpėje taip pat skatino drambliažolės mikroūglių išaknijimą *in vitro* (3.3.2 pav.). $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IAR poveikyje šaknis suformavo 5,1 karto daugiau mikroūglių nei kontroliniame variante. Maitinamojoje terpėje, papildytoje $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ IAR, šaknų formavimosi dažnis buvo 80,2 proc. didesnis, lyginant su kontrole ir 45,2 proc. didesnis, nei terpėje su $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IAR. Didinant IAR koncentraciją iki $0,3 \text{ mg l}^{-1}$ ir $0,4 \text{ mg l}^{-1}$, šaknų formavimosi dažnis nuosekliai mažėjo, tačiau buvo statistiškai patikimai didesnis nei terpėje be augimo reguliatorių.

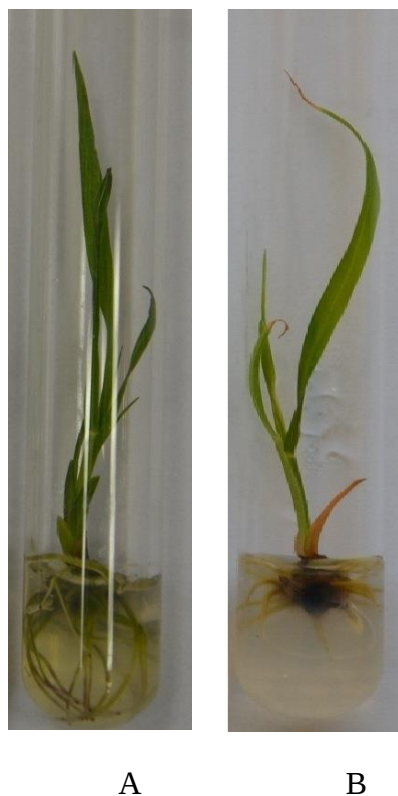


3.3.2 pav. Auksino IAR poveikis drambliažolės mikroūglių išaknijimo dažniui

ASU Agrobiotechnologijos laboratorija, 2013 – 2014 m.

Nustatyta, kad iš tirtų auksinų drambliažolės mikroūglių išaknydinimą labiau skatina NAR negu IAR. 1-naftilacto rūgšties poveikyje išsaknijo 6,2 proc. ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$), 5,9 proc. ($0,2 \text{ mg l}^{-1}$), 7,6 proc. ($0,3 \text{ mg l}^{-1}$) ir 8,1 proc. ($0,4 \text{ mg l}^{-1}$) daugiau mikroūglių nei atitinkamų koncentracijų IAR poveikyje.

Maitinamojoje terpėje papildytoje auksinu NAR drambliažolės mikroūgliai intensyviau formavo šaknis, nei maitinamojoje terpėje, papildytoje auksinu IAR (3.2.5 pav.).



3.2.5 pav. *Miscanthus x giganteus* rizogenezė *in vitro* (A – rizogenezė su auksinu NAR; B – rizogenezė su auksinu IAR)

Vertinant endogeninių veiksnių poveikį drambliažolės rizogenezei *in vitro* nustatyta, kad auksino NAR poveikyje drambliažolės mikroūglių rizogenezės procesas vyko intensyviau negu IAR poveikyje (3.2.5 pav.). Daugiausiai mikroūglių išsišaknijo maitinamojoje terpėje, papildytoje $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ NAR.

Izoliuotų *Miscanthus x giganteus* audinių, organų ir ląstelių kultūros tyrimų ypatumai skelbti keliose mokslinėse publikacijose kuriose teigiama, kad morfogeninio kaliaus indukcija, ūglių regeneracija ir jų išaknydinimas priklauso nuo maitinamosios terpės sudėties, eksplanto tipo ir jo fiziologinės būklės (Holme, Petersen, 1996; Holme, 1998; Petersen et al., 1999; Kim et al., 2010). Analizuojant mūsų tyrimų rezultatus nustatyta, kad siekiant pritaikyti izoliuotų audinių ir ląstelių kultūros metodus masiniam drambliažolės dauginimui būtina optimizuoti šio augalo regeneraciją *in vitro* parenkant optimaliausią maitinamosios terpės sudėtį priklausomai nuo pasirinkto eksplanto tipo.

IŠVADOS

1. Tirtų augimo reguliatorių poveikyje izoliuoti šakniastiebiai formavo tik pridėtinius ūglius, o šaknų segmentai – tik kalių.
2. Citokinino TDZ ir auksino NAR poveikyje izoliuotų šaknų segmentų ląstelių dediferenciacija vyko statistiškai patikimai didesniu dažniu, lyginant su BAP ir NAR deriniu. Daugiausiai (28,9 proc.) kaliaus susiformavo maitinamojoje terpėje su $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ ir $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ NAR.
3. Didžiausiu dažniu (18,0 proc.) ūglius formavo šakniastiebiai, auginti maitinamojoje terpėje su $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ ir $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ NAR.
4. Auksino α -naftilacto rūgšties poveikyje drambliažolės mikroūglių rizogenezės procesas vyko intensyviau negu 3 indolilacto rūgšties poveikyje. Daugiausiai mikroūglių įsišaknijo maitinamojoje terpėje, papildytoje $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ NAR.

2015–05–29

.....

LITERATŪRA

1. ABE, Y.; HOSHINO, Y.; KANAZAWA, A.; KONG, F.-J.; TAKAMIZOS, T.; WANG, X.; YAMADA, T.; YAMADA, T. 2011. Establishment of and efficient *in vitro* culture and particle bombardment-mediated transformation systems in *Miscanthus sinensis*. *Global Change Bioenergy*, vol. 3, p. 322–332.
2. AHONSI, M. O.; AMES, K. A.; GRAY, M. E.; BRADLEY, C. A. 2013. Biomass reducing potential and prospective fungicide control of a new leaf blight of *Miscanthus* × *giganteus* caused by *leptosphaerulina chartarum*. *Bioenerg. Research*, vol. 6, p. 737–745.
3. AMIRI, S.; KAZEMITABAR, S. K. 2011. Enhancement of callus induction and regeneration efficiency from embryo cultures of *Datura stramonium* by adjusting carbon sources and concentrations. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, p. 10101–10102.
4. ANGELINI, L. G.; CECCARINI, L.; NASSI o DI NASSO, N.; BONARI, E. 2009. Comparison of *adundo donax* L. and *Miscanthus* × *giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass and Bioenergy*, vol. 33, p. 635–643.
5. ANUSEVIČIŪTĖ, K.; JONUŠKIENĖ, I.; KOVEITĖ, E.; RAMANAUSKAITĖ, I. 2013. Naujų aminorūgščių darinių su indolo, benzoksazolinono fragmentais sintezė ir jų poveikio rapsų (*Brassica napus* L.) augimui *in vitro* tyrimas. *Cheminė technologija*, Nr. 2, p. 35.
6. AOUN, M.; CHARLES, G.; HOURMANT, A. 2008. Microproagation of three genotypes of Indian mustard (*Brassica Juncea* L. Czern.) using seedling-derived transverse thin cell layer (tTCL) explants. *Tissue and Organs*, p. 1–2.
7. ASHIKARI, M.; KAMADA-NOBUSADA, T.; KOJIMA, M.; KOMATSU, H.; KUROHA, T.; MATSUOKA, M.; MIZUTANI, M.; SAKAKIBARA, H.; SUZUKI, K.; TAKEI, K.; UEGUCHI-TANAKA, M. 2009. Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using ms-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza Sativa*. *Plant Cell Physiology*, vol. 50, p. 1202.
8. ATKINSON, C. J. 2009. Establishing perennial grass energy crops in the UK: a review of current propagation options for *Miscanthus*. *Biomass and Bioenergy*, vol. 33, p. 752–759.

9. BEALE, C. V.; BINT, D. A.; LONG, S. P. 1996. Leaf photosynthesis in the C₄ – grass *Miscanthus* × *giganteus* in the cool temperate climate of southern England. *Journal of experimental botany*, vol. 47, p. 267–273.
10. BERLETH, T.; SACHS, T.. 2001. Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 4, p. 57–58.
11. BURBULIS, N.; BLINSTRUBIENĖ, A.; KUPRIENĖ, R.; ŽILĖNAITĖ, L. 2009. *Augalų genetinės įvairovės kūrimas somatinių audinių kultūroje: mokomoji knyga*. Akademija, p. 64.
12. BUTIUC-KEUL, A.; DELIU C.; SUTEU, A. 2005. *In vitro* organogenesis of *gentiana punctata*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, vol. 33, p. 38.
13. CALDERON-VILLABOS, A. L. I.; ESTELE, M.; SANTER, A. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, vol. 10, p. 301–305.
14. CHEN, B.; GUO, H. P.; HONG, C. T; HU, K. H.; PAN, Y. H.; SUN, Y.; ZHANG, Q. X.; ZHENG, B. S.. 2012. Microproagation and plant regeneration from embryogenic callus of *Miscanthus sinensis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 48, p. 51.
15. CLIFTON-BROWN, J. C.; STAMPFLW, P.; JONES, M. B. 2004. *Miscanthus* biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. *Global Change*, vol. 10, p. 509–518.
16. CLIFTON-BROWN, J.; HASTINGS, A.; SMIYH, C. P. P.; STAMPEL, P.; WATTENBEACH, M. 2008. Potential of *Miscanthus* grasses to provide energy and hence reduce greenhouse gas emissions. *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 28, p. 465–472.
17. COLEMAN, J.; EVANS, D.; KEARNS, A. 2003. *Plant Cell Culture*. Garland Science, p. 208.
18. DA, K.; KIM, S.; MEI, C. 2012. An efficient system for high-quality large-scale microproagation of *Miscanthus* × *giganteus* plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. Blacksburg, vol. 48, p. 613–619.
19. DUBERT, F., PLAZEK, A. 2010. Improvement of medium for *Miscanthus* × *giganteus* callus induction and plant regeneration. *Acta Biologica cracoviensia series botanica*, vol. 52, p. 105–110.
20. DUCHOVSKIS, P. 2006. *Augalų morfogenezė in vitro ir jos reguliavimas: mokomoji medžiaga*. Babtai, p. 32.

21. FOWLER, P. A.; MCCLAUCHLIN, A. R.; HALL, L. M. 2003. The potential industrial uses of forage grasses including *Miscanthus*. *BioComposites Centre*, 40 p.
22. GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 32, p. 275–284.
23. GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, DE G.-J. 2008. Plant propagation by tissue culture 3rd edition. *Springer*, p. 65.
24. GLOWACKA, K.; JEZOWSKI, S.; KACZMAREK, Z. 2010 a. Impact of colchizine application during callus induction and shoot regeneration on micropagation and polyploidisation rates in two *Miscanthus* species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 46, p. 161–171.
25. GLOWACKA, K.; JEZOWSKI, S.; KACZMAREK, Z. 2010 b. The effects of genotype, inflorescence developmental stage and induction medium on callus induction and plant regeneration in two *Miscanthus* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 102, p. 79–86.
26. GOVIL, S.; GUPTA, S. C. 1997. Commercialization of plant tissue culture in *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 51, p. 65–73.
27. GREEF, J. M.; DEUTER, M. 1993. Syntaxonomy of *Miscanthus x giganteus*. *Angewandte Botanik*, vol. 67, p. 87–90.
28. HANSEN, J.; KRISTIANSEN, K. 1997. Short-term *in vitro* storage of *Miscanthus x ogiformis* Honda ‘Giganteus’ as affected by medium composition, temperature, and photo flux density. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 49, p. 161–169.
29. HIRSCH, A. M.; FANG, Y. 1994. Plant hormones and nodulation: what’s the connection? *Plant Molecular Biology*, vol. 26, p. 5–6.
30. HOLME, B. I.; PETERSON, K. K. 1996. Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus x ogiformis* Honda ‘Giganteus’. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 45, p. 43.
31. HOLME, I. B. 1998. Growth characteristics and nutrient depletion of *Miscanthus x ogiformis* Honda ‘Giganteus’ suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 53, p. 143–151.
32. HOLME, I. B.; KROGSTROP, P.; HANSEN, J. 1997. Embryogenic callus formation, growth and regeneration in callus and suspension cultures of *Miscanthus x ogiformis* Honda ‘Giganteus’ as affected by proline. Denmark. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, vol. 50, p. 203–210.

33. HOLME, I. B.; PETERSEN, K. K. 1996. Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus* × *ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 45, p. 43–52.
34. IWAKI, H.; KIMURA, M.; MUTOH, N.; OSHIMA, Y.. 1985. Species diversity and primary productivity in *Miscanthus sinensis* grasslands. 1. Diversity in relation to stand structure and dominaco. *Botanical Magazine*, vol. 98, p. 159–170.
35. JUVIK, J. A.; KIM, H. S.; WIDHOLM, J. M.; ZHANG, G. 2010. *Miscanthus* × *giganteus* plant regeneration: effect of callus types, ages and culture methods on regeneration competence. *Global Change Bioenergy*, vol. 2, p. 192–200.
36. KAIZUMA, N.; ONO, Y.; TAKAHATA, Y.1994. Effect of genotype on shppt regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus*). *Plant. Cell. Reports*, vol. 14, p. 13–17.
37. KENDE, H.; Z.; JAM A. D. 1997. The five “classical” plant hormones. *The Plant Cell*, vol. 9, p. 1197.
38. KHEHRA, G. S.; MATHIAS, R. J. 1992. The interaction og genotype explantad media on the regeneration of shoots from complex explants of *Brassica napus* L. *The Journal of the Indian Botanical Society*, vol. 21, p. 93–128.
39. KRYŽEVIČIENĖ, A.; KADŽIULIENĖ, Ž.; ŠARPŪNAITĖ, L.; DAPKEVIČIUS, Z.; TILVIKIENĖ, V. ir ŠLEPETYS, J. 2011. Cultivation of *Miscanthus* × *giganteus* for biofuel and its tolerance of Lithuanian's climate. *Žemdirbystė–Agroculture*, vol. 98, p. 267–274.
40. KUMAR, P.P.; LAKSHMANAN, P.; THORPE, T. A. 1998. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 34, p. 94.
41. LEE, G.; LEE, K. Y.; ZHANG, L. 2012. Botanical and germinating characteristics of *Miscanthus* species native to Korea. Korea. *Horticulture Environment Biotechnology*, vol. 56, p. 490–496.
42. LEWANDOWSKI, I. 1998. Propagation method as an important factor in the growth and development of *Miscanthus* × *giganteus*. *Industrial Crop and Products*, vol. 8, p. 229–245.
43. LEWANDOWSKI, I. 2006. *Miscanthus* – a multifunctional biomass crop for the future. In: JEŻOWSKI, S.; WOJCIECHOWICZ, M. K.; ZENKTELER, E. *Alternative Plants for Sustainable Agriculture*, vol. 5, p. 83–90.

44. LEWANDOWSKI, I.; CLIFTON-BROWN, J. C.; SCURLOCK, J. M. O.; HUISMAN, W. 2000. *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy*, vol. 19, issue 2000, p. 209–227.
45. LEWANDOWSKI, I.; SCHMIDT, U. 2006. Nitrogen, energy and land use efficiencies of *Miscanthus*, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. *Agroculture, Ecosystems & Environment*, vol. 112, p. 335–346.
46. LINDE-LAURSEN, I. B. 1993. Cytogenetic analysis of *Miscanthus* ‘Giganteus’, an interspecific hybrid. *Hereditas*, vol. 119, p. 297–300.
47. MARKS, T. R. 1996. The role of the shoot apex in controlling rhizogenesis *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, vol. 20, p. 57.
48. MOHAMED-YASSEEN, Y. 2001. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 37, p. 204.
49. MOON, Y.; CHA, Y.; CHOI, Y.; YOON, Y.; KOO, B.; AHN, J. W.; AN, G.; KIM, J.; PARK, K. 2013. Diversity in ploidy levels and nuclear DNA amounts in Korean *Miscanthus* species. *Euphytica*, vol. 193, p. 317–326.
50. MOTA, da T. R.; OTONI, W. C.; PAIVA, NETO de V. B. 2003. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 75, p. 159.
51. MURASHIGE, T.; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, vol. 15, p. 473–497.
52. MURCH, S. J.; CAMPBELL, S. S. B.; SACENA, P. K. 2001. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulations of auxin-induced root organogenesis in *in vitro*-cultured explants of St. John’s work (*Hypericum perforatum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 37, p. 786.
53. NAIDU, S. L.; LONG, S. P. 2004. Potential mechanisms of low temperature tolerance of C₄ photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: an *in vivo* analysis. *Planta*, vol. 220, p. 145–155.
54. NIELSEN, J. M.; BRANDT, K.; HANSEN, J. 1993. Long-term effects of thidiazuron are intermediate between benyladenine, kinetin or isopentenyladenine in *Miscanthus sinensi*. *Plant. Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 35, p. 173 – 174.
55. PETERSEN, K. K.; HANSEN, J.; KROGSTRUP, P. 1999. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus × ogiformis* Honda ‘Giganteus’. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 58, p. 189–197.

56. PETERSON, K. K. 1997. Callus induction and plant regeneration in *Miscanthus x Ogiformis* Honda 'Giganteus' as influenced by benzyladenine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 49, p. 137.
57. PETERSON, K. K.; HANSEN, J.; KROGSTROP, P. 1999. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 58, p. 189 – 190.
58. PHILLIPS, G. C. 2004. *In vitro* morphogenesis in plant – recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 40, p. 342.
59. RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 38, p. 116 – 117.
60. RAMBAUD, C.; ARNOULT, S.; BLUTEAU, A.; MANSARD, M. C.; BLASSIAU, C.; BRANCOURT-HULMEL, M. 2013. Shoot organogenesis in three *Miscanthus* species and evaluation for genetic uniformity using AFLP analysis. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, vol. 113, 437–448.
61. RUGIENIUS, R.; LUKOŠEVIČIŪTĖ, V.; STANIENĖ, G.; STANYS, V. 2008. Žemės ūkio augalų atsparumo šalčiui tyrimai *in vitro*. Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės instituto ir Lietuvos žemės ūkio universiteto mokslo darbai. *Sodininkystė ir daržininkystė*, vol. 27, p. 47–59.
62. SLIESARAVIČIUS, A.; STANYS, V. 2005. *Žemės ūkio augalų biotechnologija*. Vilnius, p. 234.
63. TARAKANOVAS, P.; RAUDONIUS, S. 2003. *Agronominių tyrimų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, STAT-PLOT iš paketo „Selekcija“ ir „Irristat“*. Akademija, Kėdainių r., p. 57.
64. WERNET, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V. SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMULLING, T. 2003. Cytokinin-deficit transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*, vol. 15, p. 2532–2550.
65. ZHAO, L.; HU, H.; ZHAN, H.; DIAO, Y.; JIN, S.; ZHOU, F.; HU, Z. 2013. Plant regeneration from the embryogenic calli of five major *Miscanthus* species, the non-food biomass crop. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 49, p. 383–387.
66. ZINKEVIČIUS, R.; JASINSKAS, A.; URBONAS, S. 2013. Sintetiniam dyzelinui gaminti ruošiamos drambliažolės (*Miscanthus*) fizikinių – mechaninių savybių tyrimas. *Žemės ūkio inžinerija*, vol. 45, p. 158–172.

67. ZUR, I.; DUBAS, E.; SLOMKA, A.; DUBERT, F.; KUTA, E.; PLAZEK, A. 2013. Failure of androgenesis in *Miscanthus x giganteus* *in vitro* culture of cytologically unbalanced microspores. *Plant reprod*, vol. 26, p. 297–307.

DARBO APROBACIJA IR PUBLIKACIJA

ARMONAITĖ, I. 2015. Drambliažolės mikroūglių įšaknydinimas *in vitro*. *Jaunasis mokslininkas 2015*: studentų mokslinė konferencija: pranešimų rinkinys. Akademija (Kauno r.), p. 100—102 (priedas Nr.1).

PRIEDAI

DRAMBLIAŽOLĖS MIKROŪGLIŲ ĮSAKNUIMAS *IN VITRO*

Ineta AFMONAITĖ

Vadovė doc. dr. Antra Blinstrubienė

Aleksandro Stulginskio universitetas, Agronomijos fakultetas, Biologijos ir augalų biotechnologijos institutas
el. paštas: babūj@asu.lt

Įvadas

Miscanthus x giganteus yra sterilus triploidas (diploido *M. sinensis* ir tetraploido *M. sacchariflorus* hibridas), natūraliai atsiliančis nuo poklepių, todėl dauginasi išskirtinai vegetatyviniais būdais. Drambliakolė yra dauginama: takmies-tiebinis tolinis augalas, kuriam būdinga C_4 fotosintezės eiga, kilęs iš Azijos tropinių ir subtropinių regionų (Greef, Dentar, 1993; Linde-Laurson, 1993). Pasitymį puikiai galimybe konvertuoti Saulės energiją į biomasės energiją (Lewandowski, Schmidt, 2006), taip pat – meta CO_2 emisiją ir puikiai atsparumui saurai ir druskoms (Clifton-Brown et al., 2004; Hastings et al., 2008). Dėl didelės biomasės ir aukštos kokybės celuliozės darlas *Miscanthus* galima priskirti prie labai naudingų nemaistinių augalų (celuliozės bei įvairių pakuočių gamyboje, stogų dengimui, užterėtų laukų skėtimui, valgomųjų grybų auginimui) (Fowler et al., 2003), o Europoje dauginama dėmesio skiriama *Miscanthus* gen-tizi, kaip potencialios energijos šaltinio. Drambliakolė yra šilumamėgis augalas, nes produktyvi reprodukcija galima esant aukštesnei kaip $20\ ^\circ C$ temperatūrai (Naidu, Long, 2004; Lewandowski, 2006). Šilumos poreikis labai padidina produkcijos kainą. Dėja, didelės išlaidos sodinamoms medžiagos padengimui ir būtinai namams augalų kiekis ploto vienetai apriboja platusi *Miscanthus x giganteus* auginimą ir panaudojimą (Atkinson, 2009).

Mikrodauginimas sudaro sąlygas greitai padauginėti svarbią medžiagą ne tik selekcinėmis programoms. Dauginant augalus *in vitro* išvengiama sezoninio, apskaitinių maristėnų panaudojimas leidžia dešimteriopai padidinti medžiagą, padauginus medžiagą lengva gauti ir vykdyti tarptautinius mainus (Govil, Gupta, 1997). Isoliuotą *Miscanthus x gi-ganteus* audinių, organų ir ląstelių kultūros tyrimų ypatumai skelbti keliose mokslinėse publikacijose (Holme, Petersen, 1996; Holme, 1998; Petersen et al., 1999; Kim et al., 2010). jona taigiama, kad morfogenezio kaliam indukcija, ūglių regeneracija ir jų įtaknydinimas priklauso nuo maitinamosios terpės sudėties, eksplanto tipo ir jo fiziologinės būklės. Siekiant pritaikyti izoliuotą audinių ir ląstelių kultūros metodus masiniam drambliakolės dauginimui būtina optimizuoti šio augalo regeneraciją *in vitro*.

Tyrimų tikslas: nustatyti aukštinę poveikį drambliakolės mikrotglių įtaknyjimui *in vitro*.

Tyrimų metodai ir sąlygos

Tyrimai atlikti 2012–2013 metais Aleksandro Stulginskio universiteto Biologijos ir augalų biotechnologijos insti-tute ir Agrobiotechnologijos laboratorijoje. Drambliakolės rizogenezė *in vitro* pasirinkti 1,5–3,0 cm ilgio mikrotgliai, indukuoti somatinių audinių kultūroje. Mikrotgliai auginti Murashige ir Skoog (MS) (Murashige, Skoog, 1962) (0,5 MS makro- ir 0,5 MS mikro-) maitinamojoje terpėje, papildytoje skirtingomis 1-nafilacto rūgšties (NAR) (0–0,4 mg l⁻¹) ir 3-indolilacto rūgšties (IAR) (0–0,4 mg l⁻¹) koncentracijomis bei 10 g l⁻¹ sacharozės ir 8 g l⁻¹ Difco-Bacto agaru. Terpės pH – $5,7 \pm 0,1$.

Mikrotglių izoliavimas bei kultūros perkėlimas vykdytas aseptinėmis sąlygomis. Sterili kultūra auginta mėgintuvė-linėse, talpinančiuose 5 ml maitinamosios terpės, auginimo kambarėje, kuriose tviesos intensyvumas – $50\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$, fotoperiodas – 16/8 h (dieną/naktį), aplinkos temperatūra – $22 \pm 2\ ^\circ C$.

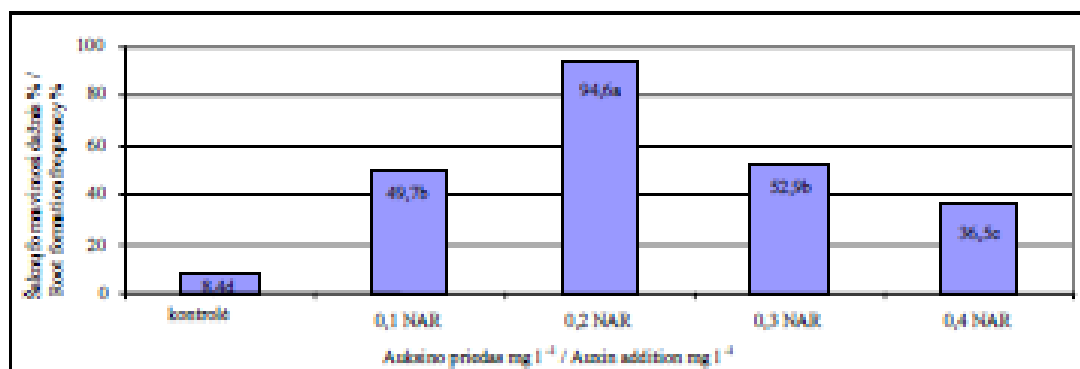
Ekperimento metu buvo auginama po 60 kiekvieno varianto mikrotglių, tyrimas atliktas trimis pakartojimais. Var-tintais mikrotglių įtaknyjimo duomenis (%).

Duomenys statistškai apdoroti kompiuterinėmis programomis STAT 1,55 ir ANOVA iš programų paketo SE-LEKCIJA (Turkanovas, Raudonius, 2003).

Tyrimų rezultatai ir analizė

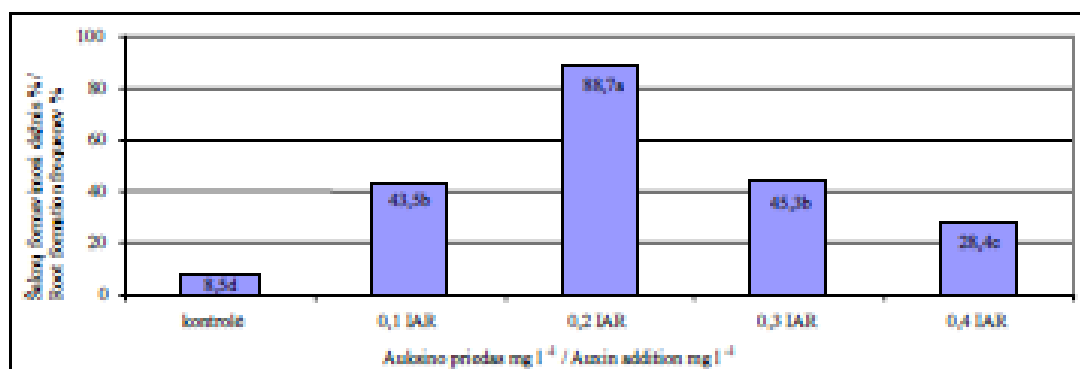
Maitinamojoje terpėje be augimo regulatorių taknis formavo vidutiniškai apie 8 proc. mikrotglių. Papildžius ri-zogenezės terpę 0,1 mg l⁻¹ NAR, taknų suiformavimo duomenis padidėjo iki 49,7 proc (1 pav.). Lyginant su kontrole, taknis suiformavo beveik 40 proc. daugiau mikrotglių, skirtumai esminiai ir statistiškai patikimi. NAR koncentracijos padidėjimas iki 0,2 mg l⁻¹ sąlygojo dar intensyvesnį taknų susidarymo procesą – taknis formavo apie 95 proc. mikrotg-lių. Toleliais tie mikro koncentracijos didinimas turėjo neigiamą įtaką drambliakolės mikrotglių įtaknydinimui, lygi-nant su terpe, papildyta 0,2 mg l⁻¹ NAR. Maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,3 mg l⁻¹ NAR ir 0,4 mg l⁻¹ NAR, taknis formavo itin mažai 52,9 proc. ir 36,5 proc. mikrotglių.

Aukštinio IAR priedas maitinamojoje terpėje taip pat skatino drambliakolės mikrotglių įtaknyimą *in vitro*. 0,1 mg l⁻¹ IAR poveikyje taknis suiformavo 5,1 karto daugiau mikrotglių nei kontroliniame variante (2 pav.). Maitina-mojoje terpėje, papildytoje 0,2 mg l⁻¹ IAR, taknų formavimosi duomenis buvo 80,2 proc. didesnis, lyginant su kontrole ir 45,2 proc. didesnis, nei terpėje su 0,1 mg l⁻¹ IAR. Didinant IAR koncentraciją iki 0,3 mg l⁻¹ ir 0,4 mg l⁻¹, taknų forma-vimosi duomenis mosekliai mažėjo, tačiau buvo statistiškai patikimi didesni nei terpėje be augimo regulatorių.



1 pav. Aukšino NAR poveikis drambliatolės mikrotiglių įsitaknijimo dažniui
Fig. 1. Effect of auxin NAA on roots formation frequency of miscanthus microshoots

Nustatyta, kad iš tirtų aukšimų drambliatolės mikrotiglių įsitaknydinimą labiau skatina NAR negu IAR. 1-naufilacto rūgšties poveikyje įsitaknijo 6,2 proc. (0,1 mg l⁻¹), 5,9 proc. (0,2 mg l⁻¹), 7,6 proc. (0,3 mg l⁻¹) ir 8,1 proc. (0,4 mg l⁻¹) daugiųjų mikrotiglių nei atitinkamų koncentracijų IAR poveikyje.



2 pav. Aukšino IAR poveikis drambliatolės mikrotiglių įsitaknijimo dažniui
Fig. 2. Effect of auxin IAR on roots formation frequency of miscanthus microshoots

Įvadas

1. Drambliatolės mikrotigliai taikais *in vitro* nedideliu dažniu formavo ir terpeje be augimo regulatorių.
2. 1-naufilacto rūgšties poveikyje drambliatolės mikrotiglių rizogenezės procesas vyko intensyviau negu 3-indolilacto rūgšties poveikyje.
3. Daugiamaiai mikrotiglių įsitaknijo maitinamojoje terpeje, papildytoje 0,2 mg l⁻¹ NAR.

Literatūra

1. ATKINSON, C. J. 2009. Establishing perennial grass energy crops in the UK: a review of current propagation options for *Miscanthus*. *Biomass and Bioenergy*, vol. 33, p. 752–759.
2. CLIFTON-BROWN, J. C.; STAMPFLW, P.; JONES, M. B. 2004. *Miscanthus* biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. *Global Change*, vol. 10, p. 509–518.
3. FOWLER, P. A.; MCCLAUCHLIN, A. R.; HALL, L. M. 2003. *The potential industrial uses of forage grasses including miscanthus*. BioComposites Centre, University of Wales Bangor, UK, 40 p.
4. GOVIL, S.; GUPTA, S. C. 1997. Commercialization of plant tissue culture in India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 51, p. 65–73.
5. GREEF, J. M.; DEUTER, M. 1993. Syntaxonomy of *Miscanthus x giganteus*. *Angewandte Botanik*, vol. 67, p. 87–90.
6. HASTINGS, A. et al. 2008. Potential of *Miscanthus* grasses to provide energy and hence reduce greenhouse gas emissions. *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 28, p. 465–472.
7. HOLME, I. B. 1998. Growth characteristics and nutrient depletion of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus' suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 53, p. 143–151.

8. HOLME, I. B.; PETERSEN, K. K. 1996. Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 45, p. 43–52.
9. KIM, H. S. et al. 2010. *Miscanthus giganteus* plant regeneration: effect of callus types, ages and culture methods on regeneration competence. *GCB Bioenergy*, vol. 2, p. 192–200.
10. LEWANDOWSKI, I. 2006. *Miscanthus* – a multifunctional biomass crop for the future. In: JEZOWSKI, S.; WOJCIECHOWICZ, M. K.; ZENKTELER, E. *Alternative Plants for Sustainable Agriculture*. vol. 5, p. 83–90.
11. LEWANDOWSKI, I.; SCHMIDT, U. 2006. Nitrogen, energy and land use efficiencies of *Miscanthus*, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. *Agroecology, Ecosystems & Environment*, vol. 112, p. 335–346.
12. LINDE-LAURSEN, I. B. 1993. Cytogenetic analysis of *Miscanthus* 'Giganteus', an interspecific hybrid. *Heredity*, vol. 119, p. 297–300.
13. MURASHIGE, T.; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, vol. 15, p. 473–497.
14. NAIDU, S. L.; LONG, S. P. 2004. Potential mechanisms of low temperature tolerance of C_4 photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: an *in vivo* analysis. *Planta*, vol. 220, p. 145–155.
15. PETERSEN, K. K.; HANSEN, I.; KRØGSTRUP, P. 1999. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 58, p. 189–197.
16. TARAKANOVAS, P.; RAUDONTUS, S. 2003. *Agronominių tyrimų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, STAT-PLOT B paketo „Selektija“ ir „Irritat“*. *Akademijs, Kėdainių r.*, p. 57.

Summary

MICROSHOOTS OF MISCANTHUS ROOTING *IN VITRO*

Investigations were carried out during 2012–2013 in the laboratory of Agrobiotechnology and Biology and Plant Biotechnology Institute of Aleksandras Stulginskis University. The effect of auxins on rooting of miscanthus microshoots was investigated. The current study indicates that in medium without growth regulators rhizogenesis of microshoots can be induced in low frequency. It has been established that for rhizogenesis induction auxin NAA was more suitable in comparison with IAA. The most intensive rooting frequency of miscanthus microshoots was observed in the nutrient medium supplemented with 0.2 mg l⁻¹ NAA.