

## ***In vitro* technologijos sodo augalų selekcijai paspartinti**

**Vidmantas Stanys, Gražina Stanienė, Rytis Rugienius,  
Dalia Gelvonauskienė, Tadeušas Šikšnianas, Ingrida Mažeikienė**

*Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės institutas, Kauno g. 30, LT-54333, Babtai,  
Kauno r., el. paštas v.stanys@lsdi.lt*

Straipsnyje aptariamos izoliuotų audinių ir ląstelių sistemos panaudojimo galimybės sodo augalų selekcijoje. Nurodomi pagrindiniai moksliniai rezultatai, gauti Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės instituto (LSDI) Augalų biotechnologijos laboratorijoje augalų mikrovegetatyvinio dauginimo, tarprūšinių hibridų auginimo, naudojant izoliuotų gemalų kultūrą, poliploidinių augalų kūrimo *in vitro* sistemoje ir selekcijos *in vitro* kultūroje srityse.

Pademonstruota, kad, naudojant įvairius tiek somatinius, tiek generatyvinius augalų eksplantus ir genetinio kintamumo indukavimo agentus *in vitro* kultūroje, galima regeneruoti pageidaujama kryptimi pakitusius augalus ir sukurti pradinę selekcinę medžiagą. Įvertinus koreliacijas tarp požymių raiškos augalui esant embrioniniame bei brandaus amžiaus etapuose ir tarp požymių raiškos *in vitro* ir *in vivo*, galima sukurti selekcinės medžiagos vertinimo technologijas, paspartinančias selekcijos procesą.

**Reikšminiai žodžiai:** izoliuoti gemalai, mikrovegetatyvinis dauginimas, poliploidija, selekcija *in vitro*, sodo augalai, tarprūšiniai hibridai.

**Įvadas.** Praeitame šimtmeityje išstbulinti augalų audinių ir ląstelių auginimo *in vitro* metodai 7-tajame praecito šimtmečio dešimtmetyje buvo pradėti taikyti augalų selekcijos procese. Naujosios technologijos leido įveikti dalį selekcijos barjerų, limituojančių naujos selekcinės medžiagos sukūrimą, paspartinti patį selekcijos procesą.

Augalų mikrovegetatyvinis dauginimas, naujų unikalių genotipų kūrimas, įveikiant nesuderinamumo barjerus, poliploidizavimas *in vitro* sistemoje, selekcija audinių ir ląstelių kultūroje buvo aprašyti daugelio autorių (Miller ir kt., 1992; Stanys ir kt., 1994; Stanys, 1997; Borkowska, 2001; Harwey ir kt., 1995). Tačiau kiekvieną *in vitro* technologiją būtina adaptuoti skirtingoms augalų rūšims ir sukurti optimalias išorines ir vidines sąlygas konkrečių augalų rūšių audiniuose ir ląstelėse saugomai genetinei programai realizuoti.

Darbo tikslas – apžvelgti svarbiausius mokslinius rezultatus, gautus taikant *in vitro* technologijas sodo augalų selekciniai medžiagai kurti per paskutiniuosius 20 metų Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės institute (LSDI).

**Tyrimo objektas, metodai ir sąlygos.** Augalai. Aprašytuose eksperimentuose tirti augalai iš LSDI kolekcijų. Tirtos įvairaus ankstyvumo trešnių (*Cerasus avium*) (ankstyvųjų ‘Anta’, ‘Dniprovka’, vėlyvųjų ‘Drogano geltonoji’, ‘Altenburger

Melionkirsche', 'Frans Josif', 'Vytėnų rožinė') ir vyšnių (*Cerasus vulgaris*) ('Dolgoždanaja', 'Köroser', 'Molodioznaja', 'Tichonovskaja', 'Meteor', 'Vytėnų žvaigždė', 'Turgenevka', 'Žagarvyšnė', 'Vietinė rūgščioji', 'North Star', 'Čiornaja krunaja') laisvo apsidulkinimo būdu gautos sėklos, jų gemalai arba sėklaskiltės. Sunokusių vaisių sėklos padalytos į dvi frakcijas pagal nugrimzdimą vandenyje (nugrimzdusios ir plūduriuojančios vandens paviršiuje). Nustatytas kiekvienos frakcijos sėklų daigumas *in vivo* ir izoliuotųjų gemalų daigumas *in vitro*. Tirti japoninio svarainio (*Chaenomeles japonica*) atrinktų klonų N43, N47, N18, N9365 augimo kūgeliai ir sėklaskiltės. Serbentų (*Ribes*) genties augalų veislių ir laukinių rūšių ('Ben Lomond', 'Titania', 'Vakarai', 'Minai Šmyriov', 'Jonkheer van Tets', 'Rondom', 'Corona', 'Captivator', 'Tschornyj negus', *R. petraeum* × *R. multiflorum*, *R. multiflorum* × *R. vulgare*, *R. aureum*, *R. americanum*, *R. × uva-crispa*) sėklos ir augimo kūgeliai, taip pat braškių (*Fragaria ananassa*) veislių 'Venta', 'Dangė', 'Holiday', 'Elsanta' ir 'Redgauntlet' mikroūgliai. Obelų kryžminimo kombinacijų ('Noris' × 'Ranger', 'Noris' × 'Liberty', 'Noris' × SR0523, 'Antonovka' × 'Katja', 'Antonovka' × SR0523, 'Priam' × 'Noris', 'Priam' × 'Antonovka', 'Priam' × 'Liberty', 'Priam' × SR0523) sėklos. Atrinkti bruknės (*Vaccinium vitis-idaea*), smailialapės (*Actinidia arguta*) ir margalapės (*Actinidia kolomikta*) aktinidijos, juodavaisės aronijos (*Aronia melanocarpa*), daržinės braškės (*Fragaria × ananassa*), kininio citrinvyčio (*Schisandra chinensis*), puikiojo bijūno (*Paeonia lactiflora*), raudonojo burokėlio (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* convar. *vulgaris* var. *vulgaris*), valgomojo svogūno (*Allium cepa*), vaistinio smidro (*Asparagus officinalis*) ir *Vaccinium prestans* augalų įvairūs eksplantai.

*In vitro* sąlygos. Augalams regeneruoti naudotos maitinamosios terpės: Murashige ir Skoog (1962), Nitch ir Nitch (1969); White (1943), papildytos 0,75 mg l<sup>-1</sup> ISR, 0,2–1,0 mg l<sup>-1</sup> IAR, 0,1–3,0 mg l<sup>-1</sup> BAP, 0,2–1,0 mg l<sup>-1</sup> kinetino. Terpės pH, priklausomai nuo auginamų augalų rūšies, svyravo nuo 4,5 iki 6,2. Visi izoliuotieji gemalai du mėnesius laikyti teigiamoje, artimoje 0 °C temperatūroje, tamsoje. Izoliuotieji eksplantai auginti kultivavimo kambaryje +25 °C temperatūroje, esant 16/8 val. fotoperiodui ir 50 μm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fotonų srautui.

Poliploidizavimo ir haploidizavimo *in vitro* sąlygos. Izoliuotos sėklaskiltės, gemalai ar mikroūgliai prieš poveikį poliploidogenais buvo auginti MS maitinamojoje terpėje, papildytoje 1 mg l<sup>-1</sup> BAP. Eksplantai (sėklaskiltės, gemalai, mikroūglių fragmentai pumpurais) vieną parą buvo veikti kolchicino (0,01–1,5 %) arba orizalino (10–578 μM) skirtingų koncentracijų tirpalais. Po to nuplauti ir pasodinti į šviežią maitinamąją terpę. Haploidų indukcijai generatyviniai augalų organai (izoliuotos dulkinės, neapvaisintos mezginės arba žiedai) buvo 4–6 savaites kultivuojami B<sub>5</sub> (Gamborg ir kt, 1968) maitinamojoje terpėje, papildytoje 2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D (2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis), BAP (6-benzylaminopurinas) ir 100 g l<sup>-1</sup> sacharoze. Regeneravusių ūglių ploidiškumas buvo nustatytas sroviniu citometru („Partec“). Ūgliai su pakitusiu chromosomų skaičiumi papildomai tikrinti skaičiuojant chromosomas šaknų meristemose.

Atrankos *in vitro* sąlygos. Po 4 parų indukcijos etapo Nitch ir Nitch maitinamojoje terpėje izoliuotos obelų sėklaskiltės buvo perkeltos į Petri lėkšteles su filtriniu popieriumi, suvilgytu benzimidazolo tirpalu (0,006 %) ir užkrėstos rauplių konidijų suspensija. Ligos požymiai vertinti balais (naudojant skalę 0–4) trisdešimtą dieną po užkrėtimo (Gelvonauskienė, Stanys, 2002).

Braškių mikroūgliai 30 dienų grūdinti +2 °C temperatūroje ir 12 valandų šaldyti -11 °C temperatūroje. Po to jie buvo 12 valandų atšildomi +15 °C temperatūroje ir persodinti į šviežią maitinamąją terpę. Mikroaugalų pažeidimas buvo vertintas po 30 dienų (Rugienius, Stanys, 2001).

Eksperimentiniai duomenys įvertinti dispersinės analizės metodais, sugrupuoti pagal Dunkano kriterijų. Apskaičiuoti naudojant kompiuterinę programą „Anova Exel“, vers. 2,1 (Tarakanovas, 1999).

**Rezultatai.** Augalų regeneracijos tyrimai ir mikrovegetatyvinio dauginimo metodų rengimas. Per apžvelgiamą laikotarpį Augalų biotechnologijos laboratorijoje parengtos keliolikos augalų regeneravimo ir mikrodauginimo metodikos skirtingos diferenciacijos eksplantams (1 lentelė).

**1 lentelė.** Morfogenezės tyrimuose *in vitro* naudoti augalai

**Table 1.** Plants used for morphogenesis studies *in vitro*

Augalas Plant	Eksplantas Explant	Literatūros šaltinis Publication
1	2	3
Braškė <i>Fragaria × ananasa</i>	Augimo kūgeliai Shoot apex	Станис В. А., Станене Г. В. 1989. Всес. конф. по генет. сомат. клеток в культуре, посвящ. памяти Н. И. Шапиро. Москва, 53.
Bruknė <i>Vaccinium vitis-idea</i>	Izoliuoti pumpurai Isolated buds	Gustavsson B. A., Stanys V. 2000. Hort Science, 35(4): 742–744.
Smailalapė aktinidija <i>Actinidia arguta</i>	Augimo kūgeliai Shoot apex	Litwinczuk W., Stanys V. 2001. Folia Horticulturae, Annalis, 13/1A: 125–129.
Japoninis svarainis <i>Chaenomeles japonica</i>	Augimo kūgeliai Shoot apex	Stanienė G., Stanys V., Bobinas Č., Duchowski P., Merkys A. 1999. Zeszyty problemowe postepow nauk rolniczych, 468: 435–443.
Juodavaisė aronija <i>Aronia melanocarpa</i>	Augimo kūgeliai Shoot apex	Stanienė G., Stanys V., Bobinas Č., Duchowski P., Merkys A. 1999. Zeszyty problemowe postepow nauk rolniczych, 468: 435–443.
Juodasis serbentas <i>Ribes nigrum</i>	Izoliuoti gemalai Isolated embryos	Stanys V., Shikshnianas T., Staniene G. 1995. Norwegian Journal of Agricultural Sciences, 9(1–2): 95–104.
Kininis citrinvytis <i>Schisandra chinensis</i>	Augimo kūgeliai Shoot apex	Stanienė G., Stanys V. 2007. Sodininkystė ir daržininkystė, 26(3): 282–288.
Margalapė aktinidija <i>Actinidia kolomikta</i>	Augimo kūgeliai Shoot apex	Stanienė G., Stanys V., Bobinas Č., Duchowski P., Merkys A. 1999. Zeszyty problemowe postepow nauk rolniczych, 468: 435–443.
Naminė obelis <i>Malus domestica</i>	Sėklaskiltės Cotyledons	Станис В. А., Станене Г. В., Гялвонаускис Б. С. 1991. Физиология растений, 38(2): 293–298.
Naminė obelis <i>Malus domestica</i>	Augimo kūgeliai Shoot apex	Stanys V., Stanienė G. 1994. Sodininkystė ir daržininkystė, 13: 27–33.

**1 lentelės tęsinys**  
**Table 1 continued**

1	2	3
Paprastoji cidonija <i>Cydonia oblonga</i>	Augimo kūgeliai Shoot apex	Staniene G., Stanys V. 2004. International Conference of Baltic States. Plant tissue culture: from theory to practice. May 27–28, 2004, Salaspils, Latvia, 58.
Puikūsis bijūnas <i>Paeonia lactiflora</i>	Izoliuoti gemalai Isolated embryos	Mažeikienė I., Stanys V., Stanienė G. 2005. Sodininkystė ir daržininkystė, 24(4): 193–199.
Raudonasis burokėlis <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	Neapvaisintos mezginės Unpollinated germs	Stanys V., Stanienė G., Petronienė O. D. 1996. Biologija, 3: 60–70.
<i>Vaccinium prestans</i>	Izoliuoti pumpurai Isolated buds	Stanienė G., Stanys V., Kawecki Z. 2002. Biologija, 1: 84–86.
Vaistinis smidras <i>Asparagus officinalis</i>	Izoliuoti gemalai Isolated embryos	Žebrauskienė A., Kmitienė L., Stanys V. 2007. Sodininkystė ir daržininkystė, 26(2): 101–108.
Valgomasis svogūnas <i>Allium cepa</i>	Neapvaisintos mez- ginės Unpollinated germs	Stanys V., Kamštaitytė D., Stanienė G. 2001. Proc Latvian Academy of Sciences. Sec. B., 55(5/6): 234–236.
Valgomasis svogūnas <i>Allium cepa</i>	Izoliuoti žiedai Isolated flowers	Kamštaitytė D., Stanys V. 2002. Agriculture. Scientific articles, 2(78): 245–250.

Nustatyta, kad kultūros indukcija priklauso nuo donorinių augalų fiziologinės būsenos (Stanys ir kt., 2007). Ją galima modifikuoti keičiant eksplantų kultivavimo sąlygas. Įvairūs augalų genotipų skirtumai buvo stebėti kultūros stabilizavimo tarpsniu.

Dauginant sumedėjusius sodo augalus, rizogenezės etapas kelia daugiausia problemų. Sumedėjusių augalų rizogenezė priklauso nuo mikroūgliams dauginami naudotos maitinamosios terpės sudėties. Esant didelei (3 mg l<sup>-1</sup>) BAP koncentracijai, dauginami skirtoje maitinamojoje terpėje mikroūglių rizogenezė būna silpnesnė. Įsišaknijimui reikalingas papildomas 4 savaičių trukmės mikroūglių kultivavimas maitinamojoje terpėje be BAP. Buvo stebėta rizogenezės priklausomybė nuo maitinamosios terpės pH. Japoninio svarainio mikroūglių didžiausias rizogenezės procentas gautas, kai maitinamosios terpės pH buvo 5. Tyrimų rezultatai parodė, kad veiksniai, limituojantys rizogenezę, nėra universalūs visiems konkrečios augalų rūšies genotipams. Padaugintų augalų tyrimas parodė nemažą fenotipinį kintamumą (Stanys, 1996).

Tarprūšinių augalų hibridų auginimas naudojant izoliuotų gemalų kultūrą. Augalų išauginimas izoliuotų gemalų kultūroje priklauso nuo daugelio veiksnių (Esau, 1977). Vienas svarbiausių – gemalo išsivystymo lygis izoliavimo metu. Mūsų tyrimuose *Ribes* genties tarprūšiniai gemalai vystėsi *in vitro* sąlygomis izoliavus juos praėjus 34–83 dienoms po žiedų apdulkinimo (2 lentelė). Tačiau ankstyviausiuose raidos tarpsniuose (34–41 dienos po apdulkinimo) vystėsi tik 20–67 % gemalų. Geriau vystėsi senesni ir didesni gemalai. Tyrimuose nustatyta, kad tiek serbento, tiek margalapės aktinidijos gemalai sėkloje diferencijavosi labai sparčiai (Станис, Чесонис, 1988).

Naudojant izoliuotų gemalų auginimo techniką, sukurti kelių kartų (F2–F4) *Ribes* genties *Eucoreosma* sekcijos tarprūšiniai hibridai, kurie yra tiriami selekcinuose ir konkursiniuose augnyuose.

**2 lentelė.** Juodojo serbento izoliuotų gemalų raidos *in vitro* priklausomybė nuo jų amžiaus

**Table 2.** Dependence of development of black currant isolated embryos *in vitro*, according their age

Dienos po apdulkinimo Days after pollination	Gemalo ilgis Length of embryo, mm	Pasodinta gemalų, vnt. Planted embryos (unt.)	Vystėsi gemalų <sup>1)</sup> vnt. Developed embryos (unt.)		Vidutinis augalo aukštis Average plant height, mm <sup>-1</sup>	Diferencijuotų augalų kiekis Differentiated embryos, %
			vnt. (unt.)	%		
34	0,10	30	6	20,0 d	10,8 ± 2,14 <sup>y</sup>	16,6
36	0,32 ± 0,16 <sup>z</sup>	29	16	55,2 c	16,6 ± 2,56	50,0
41	0,35 ± 0,16	30	20	66,7 c	19,0 ± 2,47	45,0
43	0,50 ± 0,15	28	28	100 a	29,5 ± 2,00	78,6
45	0,46 ± 0,15	26	23	88,5 ab	26,3 ± 3,31	82,6
48	0,47 ± 0,15	28	24	85,7 b	27,8 ± 1,75	83,3
83	0,52 ± 0,15	30	19	63,3 c	-	84,2

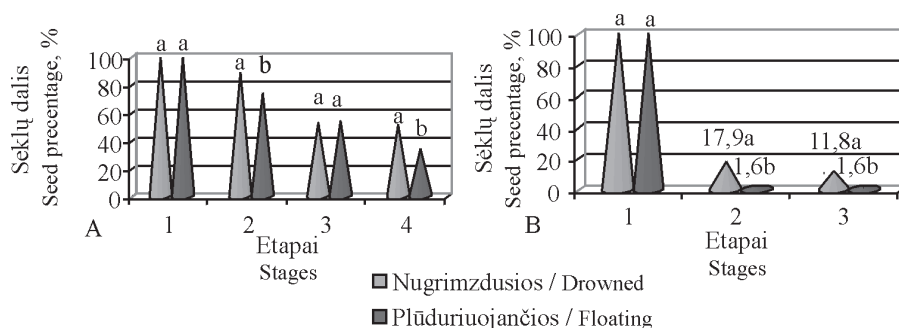
<sup>1)</sup> Ta pačia raide pažymėti vidurkiai iš esmės nesiskiria ( $R \leq 0,01$ )

<sup>2)</sup> Means marked with the same letter do not differ significantly at  $LSD \leq 0.01$

<sup>3)</sup> Vidurkis ± SD / <sup>4)</sup> Mean ± SD

<sup>5)</sup> Vidurkis ± Sx / <sup>6)</sup> Mean ± SE

Vyšnių, trešnių ir slyvų sėklų daigumas yra prastas (Schmidt, Ketzl, 1994), todėl sunku išauginti gausias sėjinukų šeimas (1 pav.). Nustatyta, kad kaulavaisinių augalų sėklų autonomiškumo formavimasis, taigi ir gebėjimas dygti ne visada sutampa su sėklų bendru brendimo ritmu (Jensen, Eriksen, 2001).



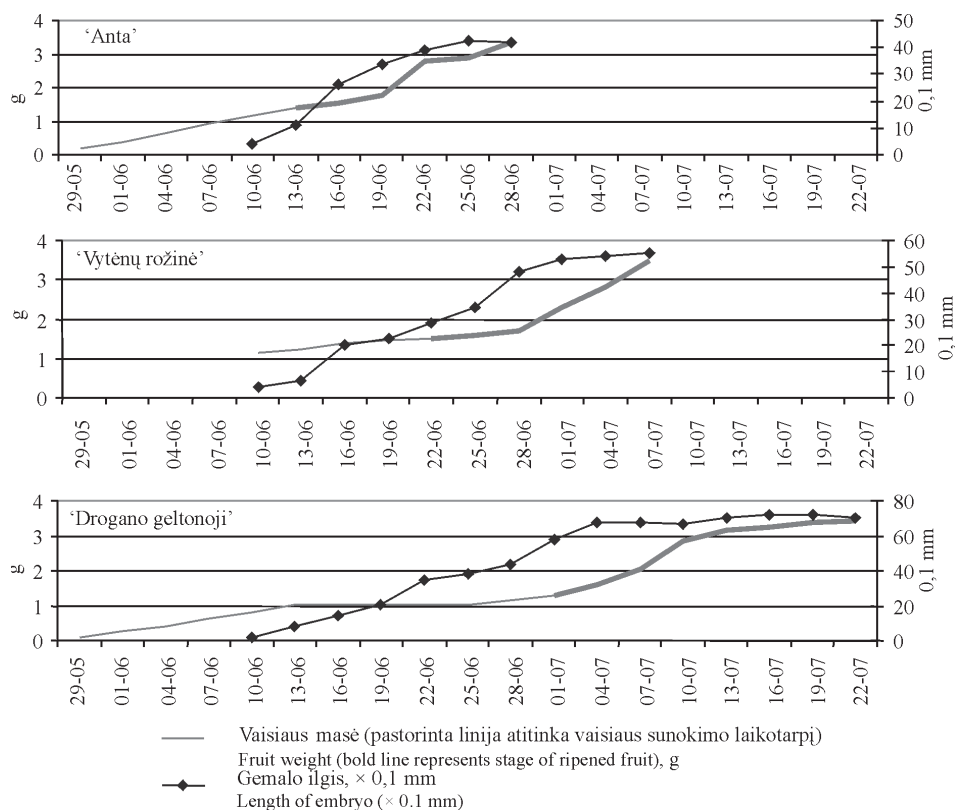
**1 pav.** Vyšnių sėklų daigumo *in vitro* (A: 1 – tirta sėklų; 2 – pasodinta gemalų; 3 – vystėsi; 4 – perkelta į selekcinį augyną) ir *in vivo* (B: 1 – tirta sėklų; 2 – sudygo; 3 – perkelta į selekcinį augyną) palyginimas.

*Pastaba:* ta pačia raide pažymėti vidurkiai iš esmės nesiskiria ( $R \leq 0,01$ )

**Fig. 1.** Comparison of sour cherry seed germination *in vitro* (A: 1 – seed quantity; 2 – planted embryos; 3 – developed embryos; 4 – moved to breeding nursery) and *in vivo* (B: 1 – seed quantity; 2 – germinated; 3 – moved to breeding nursery).

*Note:* means marked with the same letter do not differ significantly at  $LSD \leq 0.01$

Atlikti kaulavaisių sėklų vystymosi tyrimai parodė, kad sėklaskilčių diferenciacijos pradžia gemaluose priklauso nuo veislės ankstyvumo ir meteorologinių sąlygų po augalų žydėjimo (2 pav.). Atskirais metais vienodo amžiaus gemalai labai skyrėsi pagal diferenciacijos lygį. Galima išskirti tris vaisiaus vystymosi etapus. Pirmuoju etapu vyko vaisiaus masės, linijinių parametrų ir sėklų ilgio nuoseklus didėjimas. Gemalas tuo laikotarpiu išliko rutulinėje vystymosi fazėje. Šis etapas truko iki sėklaskilčių diferenciacijos pradžios. Per šį laikotarpį sėkla pasiekė maksimalų dydį. Antrajam etapui būdinga sėklaskilčių diferenciacija ir greitas gemalo linijinių parametrų didėjimas. Gemalo sėklaskilčių diferenciacija ir intensyvus augimas truko priklausomai nuo veislės ankstyvumo apie 16–20 parų. Trečiuoju etapu nuosekliai didėjo vaisiaus masė ir linijiniai parametrai. Gemalo dydis nekito. Sėkla perėjo į ramybės periodą.



**2 pav.** Trešnių gemalo augimo ir vaisiaus raidos dinamika  
**Fig. 2.** Dynamics of sweet cherry embryo growth and fruit development

Autonomiškumas atsirado tik diferencijuotuose gemaluose (5 savaitę po žydėjimo).

Per trešnių vegetacijos laikotarpį dalis vaisių nukrinta. Tyrimų metu nustatyta, kad iš tokių vaisių izoliavus 0,4–0,8 mm ilgio gemalus, iš jų 18 % regeneravo augalus.

Poliploidinių augalų kūrimas *in vitro* sistemoje. Augalų biotechnologijos laboratorijoje buvo parengta technologija, skirta indukuoti poliploidus japoninio svarainio izoliuotų meristemų ir sėklaskilčių kultūrose, veikiant eksplantus kolchicinu arba orizalinu. Buvo nustatyta, kad mikroūglių organogenezė priklausė nuo poliploidogenų koncentracijos ir ekspozicijos. Kolchicinas turėjo ryškesnį toksinį poveikį eksplantams, palyginti su orizalinu. Paaiškėjo, kad sėkminga poliploidizacija labai priklauso nuo eksplanto fiziologinės būsenos. Poliploidizuoti svarainiai pasižymėjo sumažėjusiu sėklingumu (3 lentelė).

**3 lentelė.** Įvairaus ploidiškumo japoninio svarainio vaisių charakteristika  
**Table 3.** Characteristics of different ploidy Japanese quince fruits

Ploidiškumas Ploidy	Vaisiaus masė Fruit weight, g	Sėklų skaičius vaisiuje, vnt. Seed quantity in fruit (unt.)	Vaisiaus minkštimo plotis Width of fruit flesh, mm
Diploidai Diploids	37,7	45,5	6,8
Tetraploidai Tetraploids	27,4	10,5	7,0
$R_{0,5} / LSD_{0,5}$	9,3	12,1	2,1

Serbentų selekcijoje poliploidija buvo naudojama epizodiškai. Taikant sėklų ir pumpurų kolchicinavimo metodus, sukurtos pirmosios alotetraploidinės veislės (Bauer, 1978; Nilsson, 1979). Serbentų poliploidizavimo tyrimai *in vitro* nevykdyti.

Mūsų tyrimuose poliploidogenai kolchicinas ir orizalinas slopino serbento gemalų regeneraciją *in vitro* sistemoje. Kontroliniame variante regeneravo 50 % eksplantų. Paveikus kolchicinu, priklausomai nuo bandymo varianto, regeneravo 0,8–8,1 % gemalų. Orizalinas mažiau slopino regeneraciją. Paveikus orizalinu, regeneravo 15,6–19,3 % gemalų. Daugiausia poliploidinių augalų gauta gemalus paveikus orizalino tirpalu.

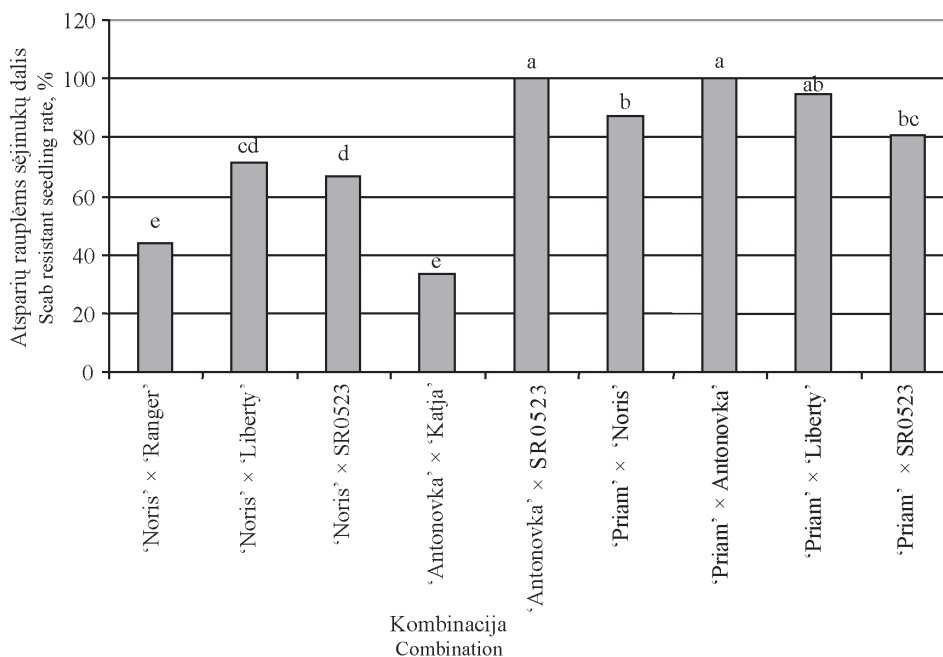
**4 lentelė.** Įvairaus ploidiškumo juodųjų serbentų morfologiniai požymiai  
**Table 4.** Morphologic traits of different ploidy black currants

Požymiai Trait	2n	4n
Lapų skaičius ant vienamečio krūmo Number of leafs on one year bush	153,50 ± 85,40	54,50 ± 27,70
Vidutinis metūglio ilgis Average length of one year shoot, cm	56,50 ± 9,4	52,25 ± 7,62
Vidutinis lapų plotas Average leaf area, cm <sup>2</sup>	52,25 ± 7,62	81,30 ± 5,09
Vidutinis žiedadulkių daigumas Average of pollen germination, %	81,30 ± 5,09	8,60 ± 1,33
Uogų skaičius kekėje Number of berries in cluster	7,25 ± 0,48	5,00 ± 0,58
Didžiausios uogos masė Weight of largest berry, g	0,93 ± 0,05	2,18 ± 0,06
Vidutinė uogos masė Average weight of berries, g	0,70 ± 0,07	1,73 ± 0,10

Veikiant poliploidogenais serbento gemalus, sukurti juodojo serbento tetraploidai, kurių  $C_1-C_2$  tiriama įvairiuose selekcinuose augynuose. Tetraploidinių ir diploidinių augalų morfologiniai skirtumai pateikti 4 lentelėje.

Augalų generatyvinių organų kultivavimas *in vitro* sudaro prielaidas išauginti haploidinius tiriamų augalų rūšių individus. Auginant neapvaisintas mezgines *in vitro* laboratorijoje, išauginti raudonojo burokėlio (Stanys ir kt., 1996), valgomojo svogūno (Stanys ir kt., 2001) ir vaistinio smidro (Žebrauskienė ir kt., 2007) haploidiniai augalai.

Selekcija *in vitro* kultūroje. Naudojant *in vitro* kultūrą, parengta atsparių rauplėms obelių sėjinukų atranka embrioniniu jų raidos tarpsniu (Stanys, Gelvonauskienė, 1995). Obelių genotipai diferencijuoti, naudojant izoliuotas nuo gemalų sėklaskiltes. Tyrimuose 40–75 % atsparių rauplėms sėjinukų buvo atrinkta šeimose, kur bent vienas iš tėvų turėjo monogeninį atsparumą. Šeimose su poligeniniu atsparumu buvo atrinkta 4–14 % atsparių sėjinukų. Sėjinukų atsparumas buvo patikrintas *in vivo*. Lauko sąlygomis atsparūs išliko 33–43 % individų iš šeimų su poligeniniu atsparumu ir 66–100 % individų iš šeimų su monogeniniu atsparumu (3 pav.). Parengtoji *in vitro* atsparių rauplėms sėjinukų atrankos sistema leidžia jau kryžminimo metais identifikuoti atsparius rauplėms sėjinukus, sutrumpinti selekcijos procesą ir sumažinti darbo sąnaudas.



**3 pav.** Atsparių rauplėms sėjinukų medelyne procentas nuo atrinktų *in vitro* augalų skaičiaus. Ta pačia raide pažymėti vidurkiai iš esmės nesiskiria ( $R \leq 0,01$ )

**Fig. 3.** Percent of scab resistant seedling in the nursery comparing with number of plants selected *in vitro*. Means marked with different letter does not differ significantly at  $p \leq 0,01$

Augalų biotechnologijos laboratorijoje parengta braškių genotipų pagal atsparumą šalčiui diferencijavimo *in vitro* sistema (Rugienius, Stanys, 2001). Augalų genotipai diferencijavosi -9–11 °C temperatūrų intervale. Įvertinus augalų atsparumą *in vivo* sąlygomis, buvo nustatyta stipri koreliacija ( $r = -0,78$ ) tarp atsparumo šalčiui *in vitro* ir ištvermingumo žiemą, tarp atsparumo šalčiui *in vitro* ir *in vivo* egzistuoja dar stipresnė koreliacija ( $r = -0,83$ ). Šis metodas tinka ankstyvai augalų atsparumo šalčiui diagnostikai ir paspartina selekcijos procesą.

**Aptarimas.** Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės institute, rengiant augalų mikrovegetatyvinio dauginimo ir selekcinės medžiagos kūrimo metodus, atlikus tyrimus *in vitro* sistemoje, nustatyta, kad izoliuotų audinių ir ląstelių auginimo metodai leidžia sėkmingai kurti pradinę selekcinę medžiagą manipuluojant ir genetinio, ir epigenetinio kintamumo galimybėmis. Nustatyta, kad poliploidogenai kolchicinas ir orizalinas gali būti labai efektyviai naudojami vaisinių sodo augalų, taip pat ir kitų vegetatyviniu būdu dauginamų augalų poliploidus indukuojant *in vitro* kultūroje (Väinölä, 2000). Taikant parengtus metodus, pirmą kartą sukurti japoninio svarainio tetraploidai, nustatyta jų vaisių morfologinių savybių priklausomybė nuo augalų ploidiškumo lygio. Poliploidizuojant *in vitro* sąlygomis izoliuotus juodojo serbento gemalus, sukurtas gausus selekcinis tetraploidinių serbentų fondas. Išauginti tarprūšiniai serbentų hibridai tokiose kryžminimo kombinacijose, kuriose įprastais selekcijos metodais iki šiol nepavyko gauti gyvybingų palikuonių. Taikant šiuos metodus, pavyko iš esmės padidinti augalų atsparumą grybinėms lapų ligoms (Šikšnianas ir kt., 2005), sukurti vėlai žydinčius augalus, taip pat sumažinti pavasarinių šalnų poveikį. Izoliuotų gemalų metodas leido iš esmės padidinti kaulavaisinių augalų sėjinukų išeią, suteikė galimybę regeneruoti augalus ir iš ankstyvųjų veislių, kurių gemalai nebūna visiškai išsivystę. Metodas neturi selektyvumo tendencijos. Izoliuoti gemalai, nepriklausomai nuo jų prigimties, vystosi *in vitro*. Taikant šį metodą, galima reanimuoti nedaigių sėklų gemalus (Rammning, 1990).

Atranka ankstyvais individų išsivystymo periodais paspartina selekcijos procesą, mažina selekcinio darbo sąnaudas. Izoliuotų audinių ir ląstelių auginimo metodas sudaro galimybes selektyvinėms sistemoms naudoti ne tik subrendusių augalų, bet ir embrionų audinius ankstyvaisiais individo raidos laikotarpiais. Atsparumo biotiniams ir abiotiniams veiksniams raiškos atitikimas embrioniniame ir reproduktyviniame augalų išsivystymo perioduose nulemia *in vitro* metodų panaudojimo korektiškumą ir efektyvių selekcijos technologijų kūrimą.

**Išvados.** Naudojant genetinio kintamumo indukavimo agentus *in vitro* sistemoje, galima regeneruoti pageidaujama kryptimi pakitusius augalus ir sukurti pradinę selekcinę medžiagą naudojant tiek somatinius, tiek generatyvinius eksplantus.

Įvertinus koreliacijas tarp požymių raiškos augalo embrioniniu ir brandaus amžiaus etapais, tarp požymių raiškos *in vitro* ir *in vivo*, galima sukurti selekcinės medžiagos vertinimo technologijas, paspartinančias selekcijos procesą.

Gauta 2008-07-21

Parengta spausdinti 2008-07-30

## Literatūra

1. Bauer R. 1978. Iosta, eine neue Beerenobstart auf der Kreuzung Schwarze Johannisbeere x Stachelbeere. *Erwerbsobstbau*, 20(6): 116–119.
2. Borkowska B. 2001. Morphological and physiological characteristics of micro-propagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. *Scientia Horticulturae*, 89(3): 195–206.
3. Esau K. 1977. *Anatomy of seed plants*. John Wiley and Sons, New York/Santa Barbara/London/Sydney/Toronto.
4. Gamborg O. L., Miller R., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 157–158.
5. Gelvonauskienė D., Stanys V. 2002. Comparison of screening methods for scab resistant seedlings. *Agricultural sciences*, 4: 23–27.
6. Harvey C. F., Fraser L. G., Kent J., Steinhagen S., McNeilage M. A., Guijun Y. 1995. Analysis of plants obtained by embryo rescue from an interspecific *Actinidia* cross. *Scientia Horticulturae*, 60(3–4): 199–212.
7. Jensen N., Eriksen E. N. 2001. Development of primary dormancy in seeds of *Prunus avium* during maturation. *Seed Science and Technology*, 29(2): 307–320.
8. Miller A. R., Scheerens J. C., Chandler C. K. 1992. Enhanced strawberry seed germination through *in vitro* culture of cut achenes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(2): 313–316.
9. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–479.
10. Nilsson F. 1979. Kroma nytt barslag. *Kommery handeln Viola Tradgardvarlden*, 16(1): 7.
11. Nitch J. P., Nitch C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163(85): 85–87.
12. Ramming D. W. 1990. The Use of Embryo Culture in Fruit Breeding. *HortScience*. 25(4): 393–398.
13. Rugienius R., Stanys V. 2001. *In vitro* screening of strawberry plants for cold resistance. *Euphytica*, 122: 269–277.
14. Stanys V., Shikshnianas T., Staniene G. 1994. Embryo development and embryo rescue within the genus *Ribes*. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, 9: 95–104.
15. Stanys V., Gelvonauskienė D. 1995. Screening of apple seedlings in embryonic phase for the resistance to scab in cotyledon culture. *Žemės ūkio mokslai*, 1: 57–61.
16. Stanys V., Stanienė G., Petronienė O. D. 1996. Plant regeneration from unfertilised red beet ovaries. *Biologija*, 3: 60–70.
17. Stanys V. 1996. Variation during micropropagation of plants. *Problems of fruit plant breeding*. Jelgava, 140–145.
18. Stanys V. 1996. *In vitro* culture in the plant breeding. Variability and stability: abstract of habilitate doctor thesis. Baktai.

19. Stanys V., Kamštaitytė D., Stanienė G. 2001. Gynogenesis of onion cultivars. Proceedings of Latvian Academy of Sciences. Sec. B., 55(5/6): 234–236.
20. Stanys V., Mažeikienė I., Stanienė G., Šikšnianas T. 2007. Effect of phytohormones and stratification on morphogenesis of *Paeonia lactioflora* Pall. isolated embryos. Biologija, 53(1): 27–30.
21. Schmidt H., Ketzal A. 1994. Raising sweet cherry seedlings by using *in vitro* techniques. Progress in Temperate Fruit breeding. Printed in the Netherlands. 381–383.
22. Šikšnianas T., Stanys V., Stanienė G., Sasnauskas A., Rugienius R. 2005. American black currant as donor of leaf disease resistance in black currant breeding. Biologija, 3: 65–68.
23. Tarakanovas P. 1999. Statistinių duomenų apdorojimo programos paketas „Selekcija“. Akademija, Kėdainių r.
24. Väinölä A., 2000. Polyploidization and early screening of Rhododendron hybrids. Euphytica, 112(3): 239–244.
25. White P. R. 1943. A handbook of plant tissue culture. J. Cattell, Lancaster, Pa.
26. Žebrauskienė A., Kmitienė L., Stanys V. 2007. The influence of kinetin and gibberellic acid (GA) on the development of embryos of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) *in vitro*. Sodininkystė ir daržininkystė, 26(2): 101–108.
27. Станис В., Чесонис С. 1988. Особенности развития плодов и семян актинидии коломикта на искусственной питательной среде. Проблемы экологического мониторинга и генетические аспекты орнитофауны и диких организмов. Вильнюс, 56–58.

SODININKYSTĖ IR DARŽININKYSTĖ. SCIENTIFIC ARTICLES. 2008. 27(3).

### ***In vitro* techniques for accelerated orchard plant breeding**

**V. Stanys, G. Stanienė, R. Rugienius, D. Gelvonauskienė, T. Šikšnianas, I. Mažeikienė**

#### *Summary*

Usage of plant isolated tissue and cell system for orchard plant breeding is discussed in this review. Main results in the fields of plant micropropagation, interspecific hybridisation using isolated embryos, creation of polyploid plants using *in vitro* techniques and *in vitro* breeding of the Laboratory of Plant Biotechnology from Lithuanian Institute of Horticulture are presented.

It was shown that it is possible to regenerate plants in desired way using somatic and generative plant explants and agents for induction of genetic variability using *in vitro* culture thus creating initial breeding material. It is possible to prepare technologies for selection of breeding material evaluating correlation between expression of desired traits during stages of embryonic and mature plants and also between expression of traits in *in vitro* and *in vivo*, thus fastening breeding process.

**Key words:** isolated embryo, micropropagation, polyploidy, breeding *in vitro*, orchard plants, interspecific hybrids.